

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1960

THÈSE

N°

747

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Edmond SCHULLER

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 20 Février 1928, à Strasbourg (Bas-Rhin)

Présentée et soutenue publiquement le 27 juin 1960

LE DOSAGE DU CALCIUM NON PROTEIQUE PAR DIALYSE SUR SERUM ET SANG TOTAL

•

Son intérêt en physiologie et pathologie humaines
notamment dans les maladies du système nerveux

Président : M. DELAY, Professeur

IMPRIMERIE
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1960

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : SCHULLER

Prénom : EDMOND

Date de soutenance : 27 juin 1960

Numéro d'ordre :

(Ces deux mentions seront complétées par le Service de la Bibliothèque)

SCHULLER (EDMOND). — Le dosage du calcium non protéique par dialyse sur sérum et sang total. — Paris, Imp. R. Foulon et Cie, 1960, in-8°, 103 p., 16 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1960, N°).

SCHULLER (EDMOND). — Le dosage du calcium non protéique par dialyse sur sérum et sang total. — Paris, Imp. R. Foulon et Cie, 1960, in-8°, 103 p., 16 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1960, N°).

SCHULLER (EDMOND). — Le dosage du calcium non protéique par dialyse sur sérum et sang total. — Paris, Imp. R. Foulon et Cie, 1960, in-8°, 103 p., 16 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1960, N°).

SCHULLER (EDMOND). — Le dosage du calcium non protéique par dialyse sur sérum et sang total. — Paris, Imp. R. Foulon et Cie, 1960, in-8°, 103 p., 16 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1960, N°).



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1960

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Edmond SCHULLER

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 20 Février 1928, à Strasbourg (Bas-Rhin)

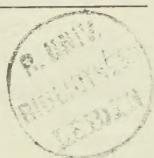
Présentée et soutenue publiquement le 27 juin 1960

**LE DOSAGE DU CALCIUM NON PROTEIQUE
PAR DIALYSE SUR SERUM ET SANG TOTAL**

•

**Son intérêt en physiologie et pathologie humaines
notamment dans les maladies du système nerveux**

Président : M. DELAY, Professeur



I M P R I M E R I E
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1960

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Aubin (A.), Bénard (H.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Champy (C.), Debré (R.), Gastinel (P.), Guillaïn (G.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Loeper (M.), Marion (G.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Olivier (E.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis, Richet (C.), Strohl (A.), Tanon (L.).

DOYEN Léon BINET
Membre de l'Institut

ASSESSEUR Jean VERNE

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
» » (Prof. à titre personnel)	ETTORI (J.)
» » (Prof. à titre personnel)	SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
» » (Prof. à titre personnel)	BOURLIÈRE (F.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	MOUQUIN (M.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon SICARD (A.)
	Cochin N...
	Hôtel-Dieu PATEL (J.)
	Pitié CORDIER (G.)
	Saint-Antoine GOSSET (J.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	Salpêtrière MOULONGUET (P.)
	Tenon LORTAT-JACOB (J.-L.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)	FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec)	DE GAUDART D'ALLAINES (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	MATHEY (J.)
Clinique de génétique médicale (Enfants-Malades)	DECOURT (J.)
Clinique gynécologique (Broca)	LAMY (M.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	FUNCK-BRENTANO (P.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	DELAY (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	MARCHAL (G.)
Cliniques médicales	N...
	Boucicaut LENÈGRE (J.)
	Broussais SOULIÉ (P.)
	Cochin JUSTIN-BESANÇON (L.)
	Cochin BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu BARIÉTY (M.)
Cliniques médicales	Pitié DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine KOURILSKY (R.)

Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	DE GENNES (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales	LACOMME (M.)
Baudelocque	MERGER (R.)
Foch (Suresnes)	VARANGOT (J.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	RENARD (G.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	AUBRY (M.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phthisiologie (Laënnec)	BERNARD (E.)
Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	N...
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique urologique (Cochin)	N...
Embryologie	GIROUD (A.)
» (Prof. à titre personnel)	TÜCHMANN-DUPLESSIS (H.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	DE SÈZE (S.)
Histologie	VERNE (J.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	
Hygiène et médecine préventive	TURPIN (R.)
» (Prof. à titre personnel)	JOANNON (P.)
Médecine du Travail	DEPARIS (M.)
Médecine légale	DESOLLE (H.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	PIÉDELIEVRE (R.)
Parasitologie	FASQUELLE (R.)
» (Prof. à titre personnel)	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	BRUMPT (L.-C.)
» (Prof. à titre personnel)	COUVELAIRE (R.)
Pathologie exotique	LAURENCE (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	LAVER (G.)
Pathologie médicale	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie respiratoire	MILLIEZ (P.)
Pathologie et thérapeutique générales	TURIAF (F.)
Pharmacologie	BOUDIN (G.)
» (Prof. à titre personnel)	CHEYMOL (J.)
Physiologie	LÉVY (Mlle J.)
» (Prof. à titre personnel)	BINET (L.)
» (Prof. à titre personnel)	BARGETON (D.)
Physiologie et pathologie obstétricale	PARROT (J.)
Physique médicale	LEPAGE (F.)
» (Prof. à titre personnel)	DOGNON (A.)
Radiologie médicale	DJOURNO (A.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	DESGREZ (H.)
Thérapeutique	LÉGER (L.)
	CONTE (M.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES ET MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

Anatomie { CABROL (C.)
COUINAUD (C.)
OLIVIER (G.)
Anatomie { GAUTHIER-VILLARS
pathologique . . (Mlle P.) *pr. s. ch.*

Anatomie pathologique . . { BUSSET (F.)
GOUYGOU (Ch.)
ORCEL (L.)
PAILLAS (J.)
Anesthésiologie . VOURC'H (G.)

MM.

Bactériologie . . .	BARBIER (P.) CHRISTOL (D.) TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.) <i>pr. s. ch.</i> POLONOVSKI (J.) <i>m. conf.</i>
Biologie appl. à l'Educat. phys. et aux Sports . .	PLAS (F.)
Carcinologie . . .	DENOIX (P.) MATHE (G.)
Dermato- Syphiligraphie . .	DUPERRAT (B.)
Electro- Radiologie . . .	LEDoux-LEBARD (G.)
Hématologie . . .	BILSKI-PASQUIER (G.) DAUSSET (J.)
Histologie	COUJARD (R.) <i>pr. s. ch.</i> MAROIS (M.) RACADOT (J.)
Hydrologie . . .	CORNET (A.)
Hygiène	BOYER (J.) <i>pr. s. ch.</i> CORRE-HURST (Mme L.)
Maladies infectieuses . . .	BASTIN (R.) DUPONT (V.)
Médecine légale	DEROBERT (L.) <i>pr. s. ch.</i> HADENGUE (A.) FOURNIER (E.) GUENIOT (M.)
Médecine du travail . . .	ALBAHARY (C.)
Neurologie . . .	LHERMITTE (F.)
Obstétrique . . .	GRANJON (A.) HERVET (E.) LE LORIER (G.) MORIN (P.) MUSSET (R.) ROBEY (M.) THOYER-ROZAT (J.)
Ophthalmologie . .	BRÉGEAT (P.) SARAUX (H.)
Orthopédie . . .	JUDET (R.) RAMADIER (J.)
Oto-rhino- laryngologie . .	DEBAIN (J.)
Parasitologie . .	CHABAUD (A.)
Pathologie chirurgicale . . .	BARCAT (J.) BINET (J.-P.) CAUCHOIX (J.) CHATELIN (C.-L.) DUBOST (Ch.) DUBOST (Cl.) FAUREL (J.) FLABEAU (F.) GERMAIN (A.)

MM.

Pathologie chirurgicale . . .	LOYGUE (J.) MERCADIER PERROTIN (J.) ROBERT (H.) THOMERET (G.)
Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Pathologie expérimentale . .	CROSNIER (J.) HARTMANN (L.) LCEPER (J.) MAURICE (J.) RICHTET (G.)
Pathologie médicale	AUSSANNAIRE (M.) BOUR (H.) BOUVIER (J.) BOUVRAIN (Y.) BRICAIRE (H.) BRISAUD (H.) BROCARD (H.) BUGE (A.) CASTAIGNE (P.) <i>m. conf.</i> CATINAT (J.) CONTAMIN (F.) COURY (C.) FREZAL (J.) HOUSSET (E.) LAROCHÉ (Cl.) LESOBRE (R.) MACREZ (C.) NICK (J.) PEQUIGNOT (H.) <i>pr. s. ch.</i> ROYER (P.) WOLFROMM (R.)
Pédiatrie- Puériculture . . .	JOSEPH (R.) MANDE (R.) MOZZICONACCI (P.) POLONOVSKI (C.) ROSSIER (A.)
Pharmacologie . .	BOISSIER (J.) LECHAT (P.)
Physiologie . . .	DEJOURS (P.)
Physique médicale	GOUGEROT (L.) <i>m. conf.</i> <i>pr. s. ch.</i> KELLERSHOHN
Pneumo- Phtisiologie . .	KREIS (B.)
Psychiatrie . . .	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile	DUCHÉ (D.)
Rhumatologie . .	DELBARRE (F.)
Stomatologie . .	CERNÉA (P.) CHAPUT (Mme A.) <i>m. conf. agr.</i> GRELLET (M.)
Thérapeutique . .	CHASSAGNE (P.) LAMOTTE (M.)
Urologie	QUENU (L.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

	MM.		MM.
Anatomie	DEBEYRE	Clinique obstétricale . .	{ GRASSET (J.) MAYER (M.) RAVINA (J.)
Clinique chirurgicale . .	{ ABOULKER (P.) AMELINE (A.) <i>pr. s. ch.</i> HUGUIER (J.) OLIVIER (C.) PADOVANI (P.) POILLEUX (F.) ROUX (M.) VERNE (J.-M.)	Clinique ophtalmologique	{ DESVIGNES (P.) OFFRET (G.)
		Clinique O.R.L.	MADURO (R.)
		Clin. pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R.)
		Clinique psychiatrique .	BARUK (H.)
		Clinique urologique . . .	KUSS (R.)
		Médecine légale	GAULTIER
Clinique médicale	{ DOMART (A.) PERRAULT (M.) RAMBERT (P.) THIEFFRY (S.)		

IV. — PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie	HAUDUIROY (P.) <i>prof. sans chaire</i>
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) <i>prof. sans chaire</i>

V. — CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

BOLTANSKI (E.) LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Secrétaires	{ Mme BEURLAND (H.), Mlle CHAINTREUIL (G.), Mme ROCHE (L.)

Conservateur en Chef	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur	Mlle DUMAITRE (P.)

Bibliothécaires	{ Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)
---------------------------	---

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

ET A CELLE DE MON PÈRE

A GENEVIÈVE

A JEAN-CHRISTOPHE ET A FLORENCE

AU DOCTEUR COLETTE SCHULLER

*Qui perpétue dans notre Franche-Comté
l'exemple unique du Médecin de campagne.*

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

Par affection, amitié ou camaraderie.

A NOTRE MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN DELAY

De l'Académie Française
et de l'Académie de Médecine

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la
présidence de cette thèse.*

*Il symbolise, à nos yeux, la persévérance
et l'enthousiasme dans la difficile recherche
des perturbations métaboliques qui ont per-
mis la naissance et le développement de la
psychopharmacologie.*

*Nous voudrions le remercier d'avoir
rendu possible ce travail dont nous espérons
qu'il s'intégrera à cette discipline nouvelle
si chargée, grâce à lui, d'espoirs : la psycho-
chimie.*

A NOS MAÎTRES DE LA SALPÊTRIÈRE

*Qui nous ont enseigné les bases de la
Neurologie et de la Psychiatrie.*

*Qu'ils veuillent bien trouver ici notre
profonde reconnaissance.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR TH. ALAJOUANINE

Membre de l'Académie de Médecine
(Clinique des Maladies du Système Nerveux)

MONSIEUR LE PROFESSEUR LÉON MICHAUX

(Clinique de Neuro-Psychiatrie Infantile)

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. GARCIN

(Clinique Neurologique)

MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL CASTAIGNE

(Propédeutique Neurologique et Neurobiologie)

MESSIEURS LES PROFESSEURS AGRÉGÉS

FRANÇOIS LHERMITTE ET JEAN NICK

Médecins des Hôpitaux de Paris

MESSIEURS LES PROFESSEURS AGRÉGÉS

F. CONTAMIN ET D.-J. DUCHÉ

MESSIEURS LES DOCTEURS

JEAN CAMBIER, H.-P. CATHALA, H. FLAVIGNY,
S. GODLEWSKI ET J. LAPRESLE

Médecins-Assistants des Hôpitaux de Paris

A NOS MAITRES DE L'HOPITAL NECKER

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN HAMBURGER

(Clinique des Maladies Métaboliques)

*Il nous a appris l'objectivité et la rigueur
dans tout travail de recherche. Son ensei-
gnement nous a déterminé à celui-ci qu'il
voudra bien, nous l'espérons, accueillir avec
indulgence.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ GABRIEL RICHET

Médecin des Hôpitaux de Paris

*Qui a bien voulu examiner les premiers
résultats de cette recherche, nous guider,
et nous encourager à la poursuivre.
Avec une très fidèle reconnaissance.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. CROSNIER

Médecin des Hôpitaux de Paris

MONSIEUR LE DOCTEUR J.-L. FUNCK-BRENTANO

Médecin-Assistant des Hôpitaux de Paris

MONSIEUR LE DOCTEUR BERNARD ANTOINE

MONSIEUR LE DOCTEUR H. DUCROT

A NOS MAITRES DE L'HOPITAL BICHAT
DE L'HOPITAL BROUSSAIS
ET DE L'HOPITAL COCHIN

*Qui nous ont appris la médecine, celle de
tous les jours sans laquelle aucune spéciali-
sation n'est possible, celle qu'on ne quitte
jamais.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ MOREAU
Membre de l'Académie de Médecine

MONSIEUR LE PROFESSEUR PASTEUR VALLERY-RADOT
de l'Académie Française
Membre de l'Académie de Médecine

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHARLES DEBRAY
(Clinique Médicale d'Hydrologie Thérapeutique et Climatologie)

MESSIEURS LES PROFESSEURS AGRÉGÉS
CL. LAROCHE ET CL. MACREZ
Médecins des Hôpitaux de Paris

MONSIEUR LE DOCTEUR MARCEL LEGRAIN
Médecin-Assistant des Hôpitaux de Paris

A NOS MAÎTRES DE L'HÔPITAL DE VAUGIRARD

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN SÈNÈQUE

(Clinique Thérapeutique Chirurgicale)

*En souvenir de sa grande bienveillance,
d'un enseignement, et surtout d'un exemple
quotidiens.*

A MESSIEURS LES PROFESSEURS AGRÉGÉS

MARCEL ROUX et C.-L. CHATELIN

Chirurgiens des Hôpitaux de Paris

MONSIEUR LE DOCTEUR D. MOREL-FATIO

Chirurgien des Hôpitaux de Paris

A TOUS CEUX QUI ONT PERMIS CE TRAVAIL

MONSIEUR LE PROFESSEUR GERMAN

Pharmacien-Chef de la Salpêtrière

Qui nous a admis dans ses laboratoires.

A. GALLI ET J. JEANMAIRE

Chefs du Laboratoire de Chimie Biologique de la Salpêtrière

Qui nous ont aidé et conseillé si amicalement.

MONSIEUR LE DOCTEUR GEORGES VERDEAUX

Chef du Laboratoire d'E.E.G.

à la Clinique des Maladies Mentales et de l'Encéphale

Il nous a accepté comme collaborateur depuis quatre ans, et nous a permis de mettre au point la polygraphie sous contrôle biochimique.

En témoignage d'une très fidèle amitié.

A HENRI CHOISY

Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Paris

En souvenir des longues soirées passées ensemble dans les laboratoires de la Salpêtrière.

« ... C'est pourquoi l'expérimentation ou l'art d'obtenir des expériences rigoureuses et bien déterminées est la base pratique et en quelque sorte la partie exécutive de la méthode expérimentale appliquée à la Médecine. Si l'on veut constituer les sciences biologiques et étudier avec fruit les phénomènes si complexes qui se passent chez les êtres vivants, soit à l'état physiologique, soit à l'état pathologique, il faut avant tout poser les principes de l'expérimentation et ensuite les appliquer à la physiologie, à la pathologie et à la thérapeutique. L'expérimentation est incontestablement plus difficile en médecine que dans une autre science; mais par cela même, elle ne fut jamais dans aucune plus nécessaire et plus indispensable. »

CLAUDE BERNARD

(« Introduction à l'étude
de la Médecine expérimentale »)

AVANT-PROPOS

Le but de ce travail est l'étude de nouvelles fractions calciques isolées à partir du sérum ou du sang de sujets normaux, selon une technique originale, proche des conditions physiologiques : la dialyse, en milieu isotonique, à pH et température contrôlés. Il ne vise qu'à essayer de définir ce qui apparaîtra peut-être dans un proche avenir comme de nouvelles constantes biologiques dont les limites peuvent déjà être esquissées.

Connaître et savoir apprécier le calcium non lié aux protéines, c'est ouvrir la porte à de nombreuses explorations tant en physiologie qu'en pathologie, et très particulièrement au niveau du système nerveux.

Le calcium du sang

I. — RÉPARTITION DU CALCIUM DANS L'ORGANISME

Le calcium constitue environ 2 % du poids total : un homme de 70 kg en recèle autour de 1.200 grammes, ce qui représente donc une réserve considérable en regard de la très faible quantité véhiculée par le sang, 95 à 105 mg par litre de sérum (5 mEq/l).

Il n'existe en effet pratiquement pas de calcium dans les globules rouges, d'où l'habitude d'exprimer le calcium plasmatique. En fait, un litre de sang ne contient que 55 à 60 mg de Ca, ce qui amène à conclure que la masse sanguine représente à peu près 350 mg de calcium. On a peu de données exactes sur le taux du Ca des liquides interstitiels, mais on a de bonnes raisons de penser qu'il représente les 2/3 du taux plasmatique. Quant au milieu cellulaire, sa teneur en calcium serait extrêmement faible.

Si les hématies sont pauvres en calcium (environ 20 mg par litre de globules), les leucocytes seraient au contraire riches en ce cation : 494 mg/litre, selon HOERHAMMER [158].

En additionnant le Ca plasmatique et celui supposé présent dans les liquides interstitiels, on n'atteint pas un gramme [87].

Le calcium apparaît comme un ion bien particulier. Le sodium, à part de rares composés insolubles, est combiné sous forme très soluble et diffusible : il ne peut jouer le rôle d'un support mécanique, et sa concentration humorale élevée suggère d'ailleurs une action osmotique. Par contre, le calcium forme, avec des anions très banaux (carbonique, phosphorique), des combinaisons peu solubles, à l'origine du tissu osseux.

Le calcium du liquide céphalo-rachidien pose un problème particulier : son taux, remarquablement fixe, représente à peu près la moitié de celui du plasma [15]. Il est évident qu'il ne s'agit pas d'un simple dialysat, car les variations du Ca plasmatique ne semblent pas l'affecter : ainsi, il demeure normal même dans la tétanie hypocalcémie.

mique, tout comme après injection de parathormone, à la différence de la lymphe ou du liquide d'œdème qui semblent traduire une simple dialyse [98, 100]. La calcirachie demeurerait toujours supérieure à 42 mg par litre [109].

MC CANCE et WATCHORN [92 et 157] ont obtenu, par ultrafiltration, des taux un peu plus élevés, mais sans tenir compte du pH ni de la température.

Le calcium tissulaire est donc la quasi-totalité du Ca total de l'organisme. Il est ainsi réparti :

- tissu osseux : 24,5 mg % ;
- muscle : 6,3 mg % ;
- foie : 6 mg % ;
- thyroïde : 33 mg % ;
- rein : 18,9 mg % ;

inépuisable source de Ca, rétablissant aussitôt toute baisse du calcium plasmatique, vraisemblablement par l'intermédiaire du protéinate. La majorité du calcium est dans le tissu osseux, les divers tissus mous n'en contenant que 11 grammes environ [23].

II. — LES DIFFÉRENTES FRACTIONS DU CALCIUM PLASMATIQUE

On ne peut réaliser une solution de formule ionique semblable à celle du plasma, et contenant autant de Ca que lui, en l'absence de substances colloïdales, le Ca étant très peu soluble en milieu alcalin en présence de phosphates et de bicarbonates.

Ce fait avait été pressenti dès 1862 par KUHNE. Au début du siècle, RONA et TAKAHASHI [126], par une dialyse de compensation effectuée grâce à une membrane de collodion, apportèrent une notion fondamentale pour l'étude du métabolisme calcique : ils séparaient le calcium plasmatique en deux fractions selon une définition physique :

- calcium ayant traversé la membrane, qui sera appelé plus tard, souvent inexactement, ultrafiltrable ou diffusible ;
- calcium demeuré dans le sac de collodion, appelé non-ultrafiltrable ou colloïdal : cette fraction a en effet été rapidement identifiée comme étant celle liée aux protéines, d'où le nom, parfois employé, de calcium « organique ».

a) LE CALCIUM NON-ULTRAFILTRABLE

En milieu alcalin, tel le plasma, les protéines se comportent comme des acides et peuvent former des protéinates avec les métaux alcalins. Ce pouvoir acide, mesuré par VAN SLYKE et MC LEAN, est d'autant plus grand que le pH du milieu est plus éloigné du point isoélectrique des protéines, point auquel celles-ci ne réagissent plus [14]. Or, 30 à 40 % du calcium plasmatique est à l'état colloïdal. RONA et PETOW, puis MARRACK et THACKER [90] ont bien montré que la proportion de Ca colloïdal du plasma varie, d'une part avec le pH comme s'il s'agissait d'un protéinate, d'autre part en fonction directe de la teneur en protéines. La quantité absolue de Ca colloïdal dépend encore de la calcémie totale dont elle suit les variations. D'où la formule de MARRACK et THACKER :

$$\text{Ca p.} - \text{Ca s.} = 0,11 \cdot \text{Pr. Ca s.}$$

Ca p. étant le Ca total, *Ca s.* le Ca diffusible,
et *Pr.* la teneur en protéines du plasma

La nature chimique du Ca colloïdal demeure encore imprécise : EICHHOLZ et STARLING ont émis, en 1925, l'hypothèse d'un complexe phospho-calcique colloïdal, mais ce fait ne semble pas avoir été démontré avec certitude. On admet actuellement qu'il y a, en moyenne, 0,84 mg de Ca par gramme de protéines. Le chiffre donné par MC LEAN [95] est un peu plus faible : 0,716. Cet auteur a établi avec HASTINGS des tables célèbres basées sur une notion simple ($\text{Ca}^{++} + \text{protéines} \rightleftharpoons \text{protéinate de Ca}$), qui permettraient de calculer le taux du Ca^{++} en fonction du Ca total et du chiffre des protéines [96]. Mais de nombreuses études mettent en doute le parallélisme de leurs variations, et ce postulat reste à démontrer [26, 120, 152]. L'une des conclusions de ce travail soulignera la très grande labilité de certains protéinates de calcium, obstacle majeur à leurs dosages.

* *

SMITH [140], en surchargeant des sérums en calcium, a observé qu'une partie du Ca ajouté en excès devenait non diffusible, peut-être après formation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en présence de phosphates. La formule de BEHRENDT :

$$(\text{Ca}^{++}) = \frac{\text{K}' (\text{H}^+)}{(\text{HCO}_3^-) (\text{HPO}_4^{--})}$$

fixe les relations entre Ca, P et CO_3H^- .

La répartition du Ca entre les diverses fractions protéiques a fait l'objet de récentes études. Certains avaient soutenu que cette liaison se faisait en totalité avec la sérum-albumine [3, 134]. Selon CARR [18], 8 ions Ca étaient complexés avec une molécule d'albumine. D'autres [30, 57, 124] décrivirent des complexes avec des globulines. PRASAD et FLINK, dans une étude d'ensemble [117], concluent que du calcium est lié à toutes les fractions protéiques, mais en proportion variable : environ 50 à 55 % du Ca protéique serait associé à la sérum-albumine, chez un sujet normal, le restant était réparti entre les β -globulines [30] et les céphalines [31]. Le groupe des γ -globulines renferme peu de Ca à l'état physiologique, mais des taux très élevés au cours des hypergammaglobulinémies ou des myélomes.

Tout récemment, JOHNSON [69] a démontré, à l'aide de Ca^{45} , la présence d'une fraction pré-albuminique très avide de calcium, six fois plus, environ, que la fraction albuminique classique.

b) LE CALCIUM ULTRAFILTRABLE

Encore appelé diffusible il représente normalement un peu plus de la moitié du Ca total. On sait qu'il est en majeure partie ionisé (Ca^{++}), mais il est très difficile de le doser de façon précise et exacte pour les raisons qu'on énumérera plus loin.

Le calcium ultrafiltrable ionisé :

Depuis plus d'un demi-siècle, on est convaincu de l'importance biologique primordiale de cette fraction calcique, mais les méthodes analytiques successivement employées ont apporté des résultats extrêmement différents allant de 14 mg [5] à 57 mg [143] par litre de sérum. Cette discordance s'explique aisément si l'on considère la diversité des techniques proposées et la difficulté d'un tel dosage : on recherche une fraction définie par une caractéristique physique PASSAGÈRE (Ca^{++}), QUI VARIE CONSTAMMENT sous la moindre influence extérieure. *Doser le calcium ionisé, c'est évaluer un « moment » du métabolisme calcique dans ses relations avec le milieu intérieur.*

Ainsi que le font très justement remarquer SOULIER et CROSNIER [143], ne sauraient être valables que des méthodes opérant à la température du corps, en milieu isotonique et tamponné au pH physiologique, ou du moins dans une zone très étroite dont les travaux de HOPKINS [65-66] donnent une idée.

Nous verrons plus loin que ces restrictions sont encore insuffisantes, et qu'en plus des conditions de séparation, interviennent celles

de la technique analytique elle-même — et notamment *la dilution du prélèvement* qui semble capitale.

Ceci explique le très petit nombre de mesures effectuées sur ce sujet, comparativement aux nombreuses ultrafiltrations de plasma livrant un « calcium ultrafiltrable » sans autre précision. Il semble cependant se dégager, des plus récents travaux, la notion d'une fraction variant entre 50 et 60 mg/l chez le sujet normal, *dans des conditions de dilution identiques*.

De toutes les méthodes proposées pour son dosage, celle de SOULIER et CROSNIER [143] est de loin la plus précise, comme la plus délicate d'ailleurs. La principale méthode antérieure était celle de MC LEAN et HASTINGS reprise par PAUPE dans sa thèse récente [109]. Elle comportait, outre une technique très délicate, de nombreuses incertitudes : on opérait à la température de la pièce, sur un matériel non homogène (cœur de batracien), avec de nombreuses interférences possibles dues aux autres ions présents, K^+ et Mg^{++} entre autres. SOULIER et CROSNIER, par contre, ont utilisé, pour identifier Ca^{++} , l'une de ses propriétés connue depuis longtemps : la coagulation d'un plasma préalablement décalcifié. Un plasma « amberlite » (résine échangeuse de cations) ne coagule que par addition d'une solution très diluée de chlorure de calcium, ou d'un sérum ayant conservé son Ca^{++} . Cette épreuve de recalcification nécessite la destruction préalable, par chauffage trente minutes à 60° , des activateurs et accélérateurs de la coagulation : ce temps modifie vraisemblablement le Ca protéique. En effet, lorsqu'on chauffe un sérum, la viscosité diminue jusqu'à 55° ; à partir de cette température, la viscosité augmente à nouveau, ce qui correspond à une modification brutale de la structure des protéines (LECOMTE DU NOUY).

Ainsi s'explique peut-être le chiffre relativement élevé (le plus haut) donné comme normal par cette méthode, qui constitue cependant un progrès important sur les précédentes : elle définit biologiquement une fraction, en opérant à la température du corps humain et en milieu tamponné. Toutefois, certains auteurs [22 bis] en reprenant la technique de SOULIER, ont obtenu des chiffres différents : 45 ± 2 mg/l — au lieu de 57 mg/l. Le tampon utilisé est celui d'OWREN (véronal — acétique) ; il sert à diluer la thromboplastine dans des proportions allant de $1/30^\circ$ à $1/50^\circ$ selon les cas. Il serait intéressant de faire des études comparatives avec le tampon de MICHAELLIS (véronal-chlorhydrique), que nous avons utilisé pour notre technique, l'acétate de calcium étant peu ionisé. La critique la plus importante qu'on puisse faire à cette méthode est la grande précision qu'elle demande : elle comporte l'usage de pipettes de pré-

cision ($1/10^e$ de ml) avec un volume final de $3/10^e$ de ml, la mesure rigoureuse d'un temps allant de 39 à 40 secondes, pour la normale, enfin, *une dilution*.

On sait, en effet que, pour un électrolyte donné, le *degré de dissociation dans un solvant donné, à température donnée, dépend uniquement de sa concentration ; en diluant le sérum à tester dans la proportion de 2 pour 1, on ionise certainement une partie du Ca*. Même en opérant avec une dilution à volume égal, nous préférons définir par la dialyse notre technique, bien que théoriquement on ne dose que le Ca^{++} .

En fait, ainsi qu'on le verra, la dialyse admet tout le calcium « diffusible » — et il apparaît possible, par différents artifices colorimétriques, de dissocier ce qui est d'emblée ionisé de ce qui est ionisable. Mais, il faut encore le répéter, c'est la dilution du plasma qui constitue le facteur d'erreur le plus considérable, si l'on veut tenter d'apprécier la fraction ionisée et non le calcium « ionisable ».

En outre, dans la technique de SOULIER et CROSNIER, on est à la merci de la moindre modification de la coagulation par un agent pharmacodynamique ; il faut encore un témoin, problème hospitalier classique du sujet « normal ».

La critique la plus importante a été faite par les auteurs eux-mêmes : dose-t-on réellement le Ca^{++} ? On ne peut que sourciller à leur conclusion : on mesure le Ca^{++} , ou le *Ca facilement ionisable*, fraction qui préside aux échanges métaboliques cellulaires. Disons d'emblée qu'avec une méthode entièrement différente, mais à la même dilution plasmatique, nous trouvons des chiffres semblables à ceux de SOULIER et CROSNIER, ce qui donne à réfléchir.

Le calcium ultrafiltrable non ionisé :

Il ne peut guère être apprécié que par différence, si l'on excepte une méthode toute récente [133]. Son taux est assez faible pour avoir même été nié par certains. Il est probablement aussi variable que celui du Ca^{++} selon la technique employée.

Dès 1901, SABATTANI avait suggéré l'existence de citrate de Ca dans le sang circulant, fait confirmé par SENDROY et HASTINGS, mais nié plus tard par GREENBERG et LARSON [52]. En fait, il existe presque certainement quelques milligrammes de citrate de Ca, ainsi que divers autres sels organiques très peu ionisés : carbonate, acétate, ou même phosphate sous forme de complexe. Le rôle de cette fraction a été très controversé : BRULL [14] suppose qu'il s'agit d'une forme de transition entre Ca colloïdal et Ca^{++} . En effet, en citratant un sang, on aug-

mente rapidement la proportion de Ca diffusible non ionisé : ce faisant, on modifie d'ailleurs le pH, ce qui prête à discussion sur l'interprétation des faits observés.

Ce calcium, quoique diffusible, est « biologiquement inutilisable », et l'on peut évoquer ici le « choc citrique », et les accidents observés au cours de certaines exsanguino-transfusions.

Une autre hypothèse est que cette fraction est une forme d'élimination, mais étant donné la difficulté de son dosage, aucune statistique suffisante n'a pu encore établir un rapport entre son taux et l'élimination urinaire du calcium.

SCHIRARDIN et METAIS [133] ont tout récemment décrit une méthode originale évaluant le Ca non ionisé : ils établissent la courbe cinétique de fixation du Ca plasmatique sur une résine échangeuse d'ions (permutite sodique), le plasma échangeant Ca contre le Na de la résine sans changement « notable » du pH du milieu. En même temps, ils dosent le calcium ultrafiltrable sur membrane de cellophane, sous pression de 4 kg/cm² d'azote. On corrige ce résultat selon la formule de MC LEAN et HASTINGS pour tenir compte de la teneur en eau du sérum. Connaissant le Ca total :

$$\text{Ca}^{++} = \text{Ca ultrafiltrable} - \text{Ca non ionisé}$$

et

$$\text{Ca protéique} = \text{Ca total} - \text{Ca ultrafiltrable}$$

Toute cette technique repose sur une notion : le Ca⁺⁺ et le Ca protéique sont fixés plus rapidement que le Ca non ionisé.

On peut lui reprocher sa longueur (trois opérations) et la dispersion des résultats chez les sujets normaux : il n'y a que 13 cas, il est vrai, mais le Ca non ionisé varie de 3 à 13 mg pour mille. D'autre part, on ne tient pas compte du pH ni de la température, ni de la dilution dont on a dit l'importance. Comme on le verra plus loin, l'existence de cette fraction diffusible non ionisée peut être démontrée par dialyse grâce à certains artifices.

Pour clore et résumer ces données de base, on trouvera, dans les tableaux ci-après, un résumé des principaux travaux et les chiffres qu'ils ont proposés pour normaux.

CALCIUM DOSE PAR ULTRAFILTRATION

<i>Auteurs</i>	<i>Nombre de déterminations</i>	<i>Ca Uf.</i>	<i>Conditions</i>
ANNING [2]	20	51 %	
CAMERON et MOOREHOUSE [15]		55 à 70 %	
CUSHNY [25]	?	60 à 70 %	Pression de 150 mmHg température ambiante
DECOURT et GUILLAUMIN [26, 55]	3	55 à 60 %	Pression de 20 à 60 cmHg température ambiante
DILLMANN et VISSCHER [29]	?	45 % 59 %	pH 7,6 pH 7
HERTZ [62]	4	43 à 61 %	Température ambiante et pression positive de N ₂
GREENBERG et GUNTHER [51]	24	42 à 68 %	Pression négative
HERBERT [61]	7	48 à 58 %	
HOPKINS [65]	?	64 à 75 %	pH de 7,2 à 7,8. Pression de 200 mm de Hg température ambiante
KIRK et KING [75]	5	56 à 81 %	A 36 degrés et pression positive de H ₂ O
J. LÉVY [85]	8	62 à 69 % 68 à 87 %	{ sur { pression de 2 sérum { atmo- { sur { sphères plasma { de N
MORRISSON [101]	8	43 à 62 %	
NEUHAUSEN et PINCUS [104]	?	40 à 62 %	Pression de 12 à 15 cm de Hg atmosphère sat. en CO ₂
NICHOLAS [105]	13	64 %	
PRASAD et FLINK [118, 120]	?	45 à 57 % m = 53,3 %	pH 7,3 à 7,7 Température: 20° ou 37°
SMITH [140]	?	55 à 62 %	pH 7 à 8
SNELL [142]	7	45 à 60 %	Température ambiante
TORIBARA, TEREPKA, DEWEY [150]	13	65 à 69 %	pH 7 à 7,6. Centrifugation
UPDEGRAFF [152]	19	41 à 54 %	Température ambiante. pH non contrôlé

CALCIUM DOSE PAR DIALYSE

<i>Auteurs</i>	<i>Nombre de déterminations</i>	<i>Ca U_f.</i>	<i>Conditions</i>
VON MEYSENBURG [99] ..	7	67 à 73 %	pH 7 à 7,4 — isotonie — température de la pièce
POULOS [116]	10	70 à 75 %	pH 7 à 7,4 — isotonie — pression de 30 à 35 mm Hg
RONA et MELLI (127)	4	64 à 69 %	pH physiologique température de la pièce

Chiffres donnés pour Ca⁺⁺

<i>Auteurs</i>	<i>Nombre de déterminations</i>	<i>Ca non diffusible</i>	<i>Ca diffusible</i> <i>non ionisé ionisé</i>	
BENJAMIN et HESS [5] ..	21	50	32-36	14-18
BEST et TAYLOR [in 109].	?	50	5	45
CARTIER [in 109]	?	40-45	10-20	40-45
KUGELMAS [in 109]	?	50	25	25
Mc LEAN et HASTINGS [95]	?	52-57	2-3	41-45
RONA et TAKAHASHI [126].	?	50	22-28	22-28
SCHIRARDIN et MÉTAIS [133]	13	45,6 ± 5,4	7,2 ± 2,9	44,8 ± 3,6
PAUPE [109]				46,5
SOLILIER et CROSNIER [143]				57 ± 2

Rôle et variations du Ca^{++}

I. — GÉNÉRALITÉS

Le rôle physiologique du calcium « libre » ou « biologiquement actif », c'est-à-dire très vraisemblablement ionisé, ou immédiatement ionisable, est de jour en jour mieux connu. On peut ainsi [17] le résumer :

- il diminue la perméabilité de la membrane cellulaire, et celle des capillaires ;
- il diminue l'excitabilité neuro-musculaire ;
- il est nécessaire pour la contraction musculaire ;
- il est indispensable pour la transmission de l'influx nerveux ;
- il est un facteur essentiel de la coagulation du sang ;
- son taux plasmatique serait en rapport direct avec la calciurie.

Toutes ces actions métaboliques ont reçu d'intéressantes précisions au cours des dernières années. Ainsi se dégagent quelques directions de recherches, si l'on peut disposer d'une méthode simple pour apprécier la fraction calcique active, ou facilement mobilisable.

II. — CALCIUM IONISÉ ET MÉTABOLISME CARDIAQUE

Les échanges ioniques qui règlent le fonctionnement neuro-musculaire sont résumés par le rapport :

$$\frac{(\text{Na}^+) + (\text{K}^+)}{(\text{Ca}^{++}) + (\text{Mg}^{++}) + (\text{H}^+)}$$

L'action du Ca^{++} est, classiquement, de type sympatho-mimétique ; en outre, il active la cholinestérase [60] ; il augmente l'amplitude des systoles tout en favorisant l'action de l'adrénaline ; tous caractères qui l'opposent point par point au K^+ . Un excès de Ca^{++} diminue la diastole et peut conduire à un stade de contracture tonique (calcium rigor). En doublant simplement la concentration calcique de cœurs de lapins perfusés, on observe l'apparition immédiate d'une fibrillation. BOWER et MENGLE ont les premiers rapporté des cas de mort chez des sujets digitalisés : chez l'animal, on observe la survenue d'une arythmie avec fibrillation ventriculaire et exitus [81].

Aucune fibrillation ne se produit en l'absence complète de Ca^{++} . En fait, il semble plus s'agir d'un équilibre entre (K^+) et (Ca^{++}) que de l'action isolée de ce dernier. La présence de Ca^{++} limite vraisemblablement l'entrée de K^+ dans les cellules. Le triphosphate d'adénosine (ATP) semble supprimer la fibrillation due à un excès calcique, sans doute en fixant du Ca^{++} . Si l'on complexe le Ca^{++} par un chélateur (calcitétracémate sodique ou EDTA), le complexe $\text{Na}_2\text{-Ca-EDTA}$ ne montre plus aucune activité sur le myocarde : le chélateur inactive biologiquement le calcium présent [110].

Une hypocalcémie potentialise certainement la toxicité myocardique d'une hyperkaliémie. Inversement, le calcium, stabilisant de la membrane cellulaire, empêche un retour du K^+ dans la cellule ; or la digitale provoque une chute importante du K^+ contenu dans le myocarde : sur l'électrocardiogramme, une élévation de Ca se traduit par un raccourcissement de l'intervalle QT, et même parfois par une inversion de la phase terminale. L'hypocalcémie allonge au contraire l'espace QT, avec une onde T petite et pointue.

MERKLEN et ses collaborateurs [97] ont provoqué, chez l'animal, des hypocalcémies, et comparé les modifications obtenues avec celles de l'hyperkaliémie. Ils ont étudié symétriquement les effets de l'injection de chlorure de calcium sur l'E.C.G.

Récemment, KABAKOW [71] a corrigé des troubles du rythme, chez des malades soumis au traitement digitalique, par des perfusions d'EDTA, avec succès semble-t-il, objectivé par l'amélioration rapide du tracé électrocardiographique.

Enfin, en dehors de ces actions purement musculaires, KATZ et LINDNER [73 bis] ont montré qu'un excès de Ca^{++} entraîne une dilatation des coronaires avec amélioration de leur débit.

Toutes ces notions sont détaillées dans l'excellent ouvrage de LARCAN et HURIET [84] qui soulignent la valeur de l'électrocardiogramme pour apprécier le taux du Ca^{++} — en tenant compte naturellement d'autres désordres électrolytiques éventuellement associés. FURMAN [44] a pu ainsi détecter une chute du Ca^{++} chez l'enfant, lors de transfusions, alors que le calcium total demeurait normal.

III. — Ca^{++} et ACTIVITÉ NEURONIQUE

Les échanges ioniques à travers les membranes cellulaires du tissu nerveux ont suscité de nombreux travaux en raison de leur très grand intérêt. Ainsi que le rappelait USSING lors d'un récent congrès international [153], c'est à HODGKIN et HUXLEY que nous devons la théorie ionique des influx nerveux.

a) AU NIVEAU DES AXONES

LOCKE, le premier, en 1894, avait suggéré le rôle du Ca^{++} sur l'excitabilité nerveuse. LOEB, en utilisant des solutions artificielles sans calcium, nota ensuite la survenue de manifestations neuro-musculaires semblables à la tétanie. BRINK observa leur disparition par addition de Ca^{++} au milieu, et le retour aux désordres si le calcium était conjugué avec un acide faible, peu ionisant, du type citrique, oxalique, tartrique ou phosphatique. Or, on le sait, la fibre nerveuse n'est pas en contact direct avec le plasma, mais elle baigne dans le milieu interstitiel, c'est-à-dire au contact de la fraction diffusible du calcium. Cette fraction agirait sur la structure physicochimique de la membrane, favorisant ou non les mouvements du Na^+ ou ceux du K^+ [102]. Selon BRINK [8], la courbe traduisant la relation entre la concentration calcique du milieu et le seuil d'excitabilité est une hyperbole, ce qui suggère une saturation à partir d'un certain seuil.

La membrane axonique recèlerait des *complexes moléculaires à action chélatrice*, ce phénomène modifiant leur perméabilité aux passages ioniques. On a observé que l'ion tétraméthyl-ammonium déplace compétitivement Ca^{++} à la surface de séparation entre membrane axonique et milieu interstitiel. De même, le DDT absorbé sur un complexe de la membrane axonique diminue son affinité pour Ca^{++} .

Très récemment [64], HODGKIN et KEYNES, grâce au Ca^{45} , ont pu étudier les mouvements du Ca^{++} en phase d'excitation ou de repos, sur les fibres nerveuses de Calmar Loligo. Ils plongent ces fibres pendant deux heures dans une eau de mer contenant du Ca^{45} , puis dans une eau de mer dépourvue de l'isotope. On observe ensuite une perte de la radioactivité d'abord très rapide (durant 15 minutes), puis plus lente (sur 20 heures environ). La phase lente correspond au calcium intra-cellulaire, tandis que la première évoque le départ rapide du Ca extra-cellulaire, fixé sur la membrane axonique. *Le Ca^{++} apparaît donc plus comme un « protecteur » que comme un constituant cellulaire* : HODGKIN et KATZ ont montré que, dans ce milieu, son taux est inférieur à 1 mEq/l. *On conçoit ainsi qu'un déficit en Ca^{++} se traduise par une excitabilité accrue avec comportement « oscillant », tendance aux décharges répétitives, et finalement survenue spontanée d'influx sans stimulus préalable* [138].

On a pu comparer l'élévation du Ca^{++} à une polarisation anodique, tandis que sa diminution simule une polarisation cathodique. Mais on ne sait pas avec certitude si le Ca^{++} est libéré de la surface extérieure de la membrane lipoïde durant le passage de l'influx [37].

Ainsi qu'on l'a vu, les mouvements du Ca^{++} dépendent de la présence de Mg^{++} ; *si le milieu manque de ce dernier, les échanges calciques augmentent* ; inversement, une surcharge calcique accroît l'excrétion du Mg^{++} (cf. p. 91). Ces deux ions apparaissent donc synergiques alors que s'affirme un net antagonisme entre K^{+} et Ca^{++} . Un excès de K^{+} bloque d'ailleurs la conduction de la fibre nerveuse [115].

Le potentiel de membrane peut être abaissé par les sels de K^{+} , alors qu'il est accru par le Ca^{++} , les anesthésiques locaux et le CO_2 : c'est d'ailleurs ainsi que l'acétazolamide peut agir, indirectement, comme inhibiteur de l'anhydrase carbonique, sur le potentiel de membrane [94].

Enfin, signalons que MONNIER a démontré, il y a une dizaine d'années, l'amortissement de l'activité rythmique du nerf sous l'influence de Ca^{++} .

b) LA TRANSMISSION GANGLIONNAIRE

Elle est, tout comme la transmission neuro-musculaire, diminuée si le ganglion est perfusé avec un liquide dépourvu de Ca^{++} ou citraté (HARVEY, BRONK).

Ce phénomène serait plus en rapport avec une chute de l'acétylcholine qu'avec l'inefficacité de celle libérée [1].

c) Ca^{++} ET ACÉTYLCHOLINE

QUASTEL [37] et ECCLES [34] ont précisé le rôle du Ca^{++} sur le potentiel des plaques terminales neuro-musculaires : celui-ci est considérablement diminué si le milieu est dépourvu de calcium. La dépolarisation du nerf terminal est modifiée dans le même sens (diminution) *soit par un excès de Mg^{++} , soit par une déficience en Ca^{++}* . Or, c'est de ce processus que dépend la libération quantitative d'acétylcholine, à partir des vésicules synaptiques, qui est à l'origine de la dépolarisation de la plaque terminale. En l'absence de Ca^{++} , la transmission neuro-musculaire est bloquée, comme l'ont montré BRINK, BRONK et LARRABEE en 1946.

Des faits curieux ont été observés récemment en clinique chirurgicale : des accidents respiratoires (2 morts sur 4 cas de PRIDGEN) sont apparus après emploi de néomycine par voie intra-péritonéale. Or, l'expérience a montré chez l'animal, que l'injection intra-veineuse de néomycine détermine un blocage neuro-musculaire, levé par la prostigmine ou les sels de calcium ou, inversement, accru par une anesthésie à l'éther et la d-tubocurarine. Il est apparu que les sels de calcium constituaient un antidote supérieur à la prostigmine au cours des intoxications par la néomycine : il s'agit probablement d'une chélation due à l'antibiotique, et cette propriété semble d'ailleurs fréquente dans le groupe des antibiotiques fongiques [24].

La composition ionique du tissu musculaire, et notamment la répartition des ions bivalents de part et d'autre de la membrane cellulaire, a fait l'objet de nombreux travaux récents.

Selon FRATER [42], un Ringer riche en Ca^{++} augmente la quantité de calcium contenue dans le milieu cellulaire. Le même phénomène s'observe si le Ringer baignant les fibres musculaires est riche en Mg^{++} .

Au cours de l'effort musculaire, on note, après une minute de travail-maximum, une discrète élévation du calcium plasmatique. DE LANNE et ses collaborateurs, qui ont observé le phénomène, pensent que cette élévation est due essentiellement à celle de la fraction protéique [83].

d) Ca^{++} ET ACTIVITÉ NERVEUSE SUPÉRIEURE

En perfusant les ventricules cérébraux avec un liquide à base de chlorure de calcium, ADAMI et SACCHI observèrent la survenue d'une *catalepsie* marquée : le même sel calcique porté au niveau de la grande citerne ne détermine aucune réaction de ce type. Le chlorure de potassium, par contre, introduit au niveau du troisième ventricule, provoque une agitation motrice avec fuite de l'animal. L'introduction de 5-hydroxytryptamine (sérotonine) dans la même région est à l'origine d'un état voisin, mais ici encore la catalepsie n'apparaît que si le produit est injecté au contact des centres para-ventriculaires. La catalepsie provoquée par l'histamine est accrue et prolongée par un sel de calcium [38]. FELDBERG a étudié avec SHERWOOD les effets de l'injection intra-ventriculaire de 0,5 à 2 mg de chlorure de calcium, qu'il compare à une anesthésie générale au penthiobarbital. Une dose de 2,5 à 5 mg de MgCl_2 entraîne, chez le chat, un sommeil profond durant quarante à soixante minutes [39]. Inversement, on sait que le sommeil s'accompagne, chez l'homme, d'une baisse de la concentration calcique atteignant 10 %.

Le tableau comparatif ci-dessous, donné par MC ILWAIN [93], résume la constitution ionique du tissu cérébral, du plasma et du liquide céphalo-rachidien.

Constituants	Cerveau	Plasma	L.C.R. (mEq/g ou ml)
Na^+	57	141	141
K^+	96	5	2,5
Ca^{++}	2	5	2,5
<i>Total :</i>	166	153	148
Cl^-	37	101	127
HCO_3^-	12	27	18
PO_4	16	2	1
Acides organiques	10	2	2
<i>Total :</i>	75	132	148
Contribution probable aux anions des :			
Protéines	(40)	20	0
Lipides	(40-50)	0	0

FOLCH-PI et ses collaborateurs ont démontré la présence de 50 % du Ca^{++} et du Mg^{++} dans les diphosphoinositides cérébraux [41]. *La formation d'acide lactique et la glycolyse augmentent au niveau du tissu cérébral dès que la concentration calcique s'abaisse, ou lorsque le taux de K^+ s'élève.* On retrouve donc au niveau des centres les mêmes modifications métaboliques que celles présentées par la membrane axonique, apparemment liées au Ca^{++} .

IV. — Ca^{++} ET COAGULATION DU SANG

Ainsi que le rappellent SOULIER et CROSNIER [143] qui, on l'a dit, basent une technique de dosage sur ce fait, le rôle exact du calcium sur la coagulation du sang est encore mal connu. La preuve de ce rôle est en effet indirecte, comme l'ont mis en évidence LOVELOCK et PORTERFIELD : elle est déduite de l'action d'agents tels que l'acide oxalique, l'acide citrique, les résines échangeuses d'ions, ou les chélateurs, voire même d'un processus physique comme la dialyse, qui suppriment le Ca^{++} , tandis que l'addition de cet ion rétablit une crase sanguine normale. Comme le font remarquer ces auteurs, toutes ces agressions ont bien d'autres effets — et la présence de leurs charges électriques modifie profondément l'équilibre électrolytique plasmatique nécessaire à l'interaction des substances colloïdes du plasma.

La coagulation du sang semble nécessiter un équilibre entre Ca^{++} et les autres ions de l'ordre de 1 pour 16.

BERGSAGEL (1955) a cru observer une interaction possible entre le Ca^{++} , la globuline antihémophilique et le facteur christmas : les préparations de ce dernier contiennent un calcium lié à des protéines, et elles perdent leur activité coagulante si on les décalcifie par dialyse, oxalate, ou résines échangeuses d'ions. Leur activité est restaurée par addition de Ca^{++} , processus qui demande plusieurs heures. Mais cette réactivation ne demande que quelques minutes si la globuline antihémophilique est présente, et sa vitesse semble dépendre directement de la quantité de globuline présente.

Bien des inconnues subsistent donc, d'autant plus que divers ions (magnésium et strontium au moins) constituent des « facteurs d'épargne » du calcium — ce qui a amené SOULIER et CROSNIER à enrichir le plasma amberlite en magnésium (M/350) pour se mettre à l'abri de cette cause d'erreur.

V. — Ca^{++} ET PARATHYROIDES

Le stimulus normal de l'activité parathyroïdienne est probablement l'hypocalcémie, cette glande endocrine maintenant la calcémie à un taux normal. L'activité parathyroïdienne se manifeste par une chute parallèle du taux du phosphore sanguin, et l'on a pu dire que le produit $\text{Ca} \cdot \text{P}$ était un meilleur index d'hypocalcémie que le chiffre du calcium lui-même [147].

La proportion de calcium lié aux protéines est d'environ 33 % [61, 65]. Divers auteurs ont rassemblé des arguments pour démontrer le contrôle de cette fraction par la parathormone. MARTIN et PERKINS ont montré qu'une augmentation de la captation du calcium par l'albumine sérique signe un hyperfonctionnement parathyroïdien. Si l'on élève artificiellement, par des perfusions, le taux du calcium sanguin, une partie devient aussitôt non-ultrafiltrable, vraisemblablement combinée sous forme colloïdale. La parathormone semble bien agir en mobilisant le calcium osseux (protéinate), mais aussi au niveau du tubule rénal.

Normalement, tout le calcium diffusible (66 %) est probablement filtré par le glomérule, mais une large proportion est réabsorbée par le tubule [148].

Il n'y a pas eu encore beaucoup d'études sur ce sujet, probablement en raison de la difficulté d'apprécier le calcium ultrafiltrable du plasma.

PRASAD et FLINK ont, tout récemment, étudié 8 sujets hyperparathyroïdiens et quelques hypoparathyroïdiens. Les 8 premiers avaient un calcium total et un calcium ultrafiltrable élevés, sauf deux : l'un avait des dosages normaux, et l'autre un calcium total normal avec une fraction ultrafiltrable élevée. Au cours des insuffisances parathyroïdiennes, calcium total et fraction ultrafiltrable étaient bas.

CANARY et KYLE [16] ont pratiqué des clearances calciques chez 5 sujets hyperparathyroïdiens, avant et après intervention. Alors que le dosage du calcium ultrafiltrable donnait $58 \pm 0,12 \text{ mg}\%$ chez les sujets normaux, les hyperparathyroïdiens possédaient un chiffre moyen de $74 \pm 0,26 \text{ mg}\%$. Mais le pourcentage de calcium ultrafiltrable par rapport au calcium total était relativement constant, allant de 58 à 64 %. La clearance moyenne du calcium, selon ces auteurs, est de $2,6 \pm 0,31 \text{ ml}$ par minute, soit $7,1 \pm 0,37 \text{ mg}$ par minute. Les hyperparathyroïdiens avaient une clearance moyenne de $3,6 \pm 0,6 \text{ ml}$ par

minute, soit $10,3 \pm 0,8$ mg par minute ; après l'intervention, ces chiffres tombèrent à $1,9 \pm 0,4$ ml/minute et $7,4 \pm 0,54$ mg/minute.

CANARY et KYLE se demandent donc si la réabsorption rénale du calcium est vraiment un effet direct de la parathormone ou si l'hypercalciurie des hyperparathyroïdiens est seulement une conséquence de l'augmentation de la fraction filtrable du calcium, les effets de la parathormone étant alors extra-rénaux.

C'est aussi l'avis de LOKEN et GORDAN [89] qui estiment que 165 à 325 mEq de calcium sont filtrés chaque jour par le glomérule, 95 à 99 % de cette quantité étant réabsorbés, d'où une clearance évaluée par eux de 1,4 à 3,9 ml/minute.

Or, étudiant 16 cas d'hyperparathyroïdie, ces auteurs notent une augmentation du calcium non protéique (dont le pourcentage demeure pourtant normal) et une élévation constante de la calciurie, sauf s'il existe une insuffisance rénale.

LLOYD et ROSE [88] ont déterminé, selon une technique précédemment rapportée [128], le calcium « ionisé » (en fait : diffusible) de 17 malades hyperparathyroïdiens. Tous avaient un calcium total élevé, et un calcium ionisé pouvant atteindre 95 mg % (la normale de leur dosage allant de 59 à 65). D'après leur travail, tous les hyperparathyroïdiens avaient un calcium protéinique normal : après l'intervention chirurgicale, on assista à une chute rapide du calcium « ionisé ».

LLOYD et ROSE citent à ce propos une étude de HELLSTROM qui aboutit aux mêmes constatations : Ca^{++} élevé et Ca protéique normal chez les hyperparathyroïdiens.

Ils pensent donc (à l'inverse de MARTIN et PERKINS) que la parathormone modifie les protéines du plasma pour les rendre moins aptes à complexer du calcium. Un sujet volontaire (normal) qui avait reçu de la parathormone présenta les modifications suivantes : son calcium total passa de 102 à 121, son Ca^{++} de 60 à 75 ; son calcium protéique de 39 à 45, et son taux de protéines de 62 à 77.

La conclusion de LLOYD et ROSE est que le dosage du Ca^{++} est d'un très grand intérêt pour le diagnostic d'un hyperfonctionnement parathyroïdien.

ROSE [129] est revenu sur ces notions dans un symposium sur le métabolisme calque, l'année dernière. Il conclut : la calciurie normale est comprise entre 120 et 250 mg par jour. Or, 86 grammes de calcium sont amenés chaque jour au contact du glomérule : en fait, en déduisant le calcium lié aux protéines et qui ne filtre pas, on peut

évaluer le calcium « excrétable » à 10,5 grammes. Estimant le calcium ultrafiltrable non ionisé à 2 mg/litre, ROSE observe que si cette fraction était seule excrétée, on aurait une calciurie quotidienne de 350 mg environ. Ce taux est donc bien proche de celui observé, et ROSE reprend à son compte l'hypothèse de CHEN et NEUMAN selon laquelle *c'est le taux du Ca ultrafiltrable non ionisé qui règle la calciurie*. Si l'on perfuse rapidement du chlorure de calcium et du citrate, on observe une élévation de la calcémie, mais surtout une calciurie six fois supérieure au taux normal. ROSE suppose donc que la calciurie dépend directement du taux de certains acides organiques du plasma (citrique et iso-citrique, notamment), qui complexent du calcium ionisé.

On voit combien ces notions demeurent discutées, et l'intérêt de poursuivre des recherches dans ce domaine qui intéresse l'endocrinologie comme la néphrologie.

VI. — Ca^{++} ET ÉQUILIBRE ACIDO-BASIQUE

Il est tout à fait certain que l'ionisation du calcium plasmatique est en rapport étroit avec le pH du milieu, donc la réserve alcaline et les divers systèmes tampon du sang [65].

RONA et TAKAHASHI avaient déjà émis l'hypothèse :

$$(\text{Ca}^{++}) = \frac{K (\text{H}^+)}{(\text{HCO}_3^-)}$$

c'est-à-dire : dans une solution de bicarbonate, la concentration en ions Ca^{++} est directement proportionnelle à la concentration en ions H^+ multipliée par une constante (qui a une valeur de 35 à 38°) et inversement proportionnelle à la concentration en ions bicarbonates [9]. Ceci explique peut-être, fait que nous avons vérifié, les mauvais résultats fournis, en chimie analytique du Ca^{++} , par des tampons à base de bicarbonates. On a vu précédemment la formule de BEHRENDT, qui tient compte des phosphates, ce qui élimine tout usage d'un tampon phosphate classique, type Soerensen.

L'étude du calcium ultrafiltrable au cours des acidoses et alcaloses respiratoires a fait l'objet d'études récentes :

— PRASAD, BROWN et FLINK [119] ont analysé l'alcalose respiratoire par hyperpnée chez des chiens inhalant ensuite un mélange de 30 % de CO_2 dans O_2 . Le calcium ultrafiltrable baisse progressi-

vement durant l'hyperpnée et s'élève au contraire en acidose respiratoire, sous CO_2 ; mais, dans ce dernier cas, on observe un phénomène de rebond, avec chute secondaire du calcium ultrafiltrable après l'épreuve :

<i>Avant</i>	<i>Pendant hyperventilation</i>	<i>25 minutes après</i>
Ca total : 98,8	98,7	101
Ca ultra : 57,7	56	66

<i>Avant</i>	<i>Inhalation de 30 % de CO_2</i>	<i>25 minutes après</i>
Ca total : 103	103	103
Ca ultra : 56,7	61	47

Ainsi donc, aucune modification du calcium total, tandis que se déroulent de profondes modifications du Ca ultrafiltrable, donc du Ca^{++} pour la majeure partie [11].

Il semble démontré que les modifications de la concentration en H^+ et PO_4 — — ont un effet antagoniste sur celle du Ca^{++} . On sait que le phosphore inorganique diminue d'environ 1/3 après trente minutes d'hyperventilation chez l'homme [10].

RAPOPORT a trouvé une chute moyenne du phosphore inorganique allant de 2,4 mg % à 1,8 mg % chez 7 sujets volontaires hyperventilés durant six minutes seulement : en même temps, le CO_2 chute de 26,3 à 20,5 et le pH s'élève à 7,71 [123]. On devine le très grand intérêt de ces notions pour lutter contre les troubles engendrés par les grands dérèglements respiratoires.

— C'est au cours des acidoses respiratoires sévères qu'on peut observer une fibrillation ventriculaire brutale.

Lors de l'inhalation de 30 % de CO_2 durant quatre heures, tandis que phosphore et potassium s'élèvent, le calcium ultrafiltrable augmente d'abord, puis retombe à peu près au chiffre normal ; mais, cinq minutes après retour à l'air libre, le potassium monte en flèche tandis que le calcium ultrafiltrable baisse rapidement. Une chute de 30 % du rapport Ca ultra/ K^+ serait un facteur important dans l'apparition d'une arythmie cardiaque avec fibrillation ventriculaire secondaire [13]. La diminution du calcium ultrafiltrable en présence de hautes concentrations de phosphore serait due à la formation d'un composé phospho-calcique non ultrafiltrable. Mais l'hyperkaliémie, à elle

seule, peut être facteur d'arythmie et de fibrillation ventriculaire au cours des hypercapnies [12].

	Sous CO_2			A l'air libre	
	Contrôle	25'	4 h	5'	25'
Ca total	108	114	118	111	105
Ca ultra	61	66	50	40	47
K ⁺ (mEq/l) ...	3,8	4,3	7,1	7,8	5,9
P	35	63	117	116	80

Ces études présentent un grand intérêt pour la compréhension de certains arrêts cardiaques brutaux observés en chirurgie thoracique : il apparaît ainsi que l'hypercapnie est un facteur important dans la pathogénie de l'arrêt cardiaque, la période critique étant la phase immédiate post-hypercapnique, celle où l'hyperkaliémie est maxima [137].

Telles sont les principales fonctions du Ca^{++} .

VII. — VARIATIONS PATHOLOGIQUES DU Ca^{++}

Ce chapitre, d'ailleurs mal connu, faute d'une méthode de dosage simple, sera brièvement esquissé ici : le but de cette thèse est de définir les conditions de dosage du calcium non protéique obtenu par dialyse du sérum ou du plasma chez les sujets normaux ; l'application de cette technique à la pathologie constituera l'objet de recherches ultérieures. Nous ne ferons ici qu'énumérer quelques grands syndromes, au cours desquels le dosage du Ca^{++} dialysable serait peut-être de quelque intérêt [cf. 145].

Il s'agit évidemment de la *tétanie*, en premier lieu. ALAJOUANINE, CONTAMIN et CATHALA [1], KLOTZ et ses collaborateurs [76], GILBERT-DREYFUS [46], DECOURT [26] et de nombreux autres, se sont penchés sur les problèmes pathogéniques de la tétanie. Il est actuellement admis qu'il ne s'agit pas d'une maladie mais d'un syndrome [1], réalisé par plusieurs voies métaboliques différentes.

Nous avons eu, déjà, l'occasion de pratiquer quelques dosages de Ca^{++} dialysable chez des malades présentant une tétanie tout à fait typique, et authentifiée par les examens électromyographiques. Sauf dans un cas, sur lequel nous reviendrons, où le calcium total se maintient depuis des années autour de 60 mg/l, tous les dosages ont livré des chiffres *normaux*, voire légèrement élevés. Nous avons

même pratiqué, chez une malade du Professeur ALAJOUANINE, un dosage avant, pendant et après hyperpnée, alors même que la malade présentait des signes neurologiques de tétanie : les trois dosages ont été normaux.

Certes GUNTHER et GREENBERG [56] avaient soutenu l'immuabilité du calcium diffusible au cours des tétanies par hyperventilation, mais nous avons vu précédemment les essais concluants de PRASAD et FLINK.

Le rôle du Mg^{++} est, par contre, de mieux en mieux connu. Tout dernièrement, nous avons pu prélever le sang d'une malade du Professeur GARCIN qui venait de faire une crise typique de tétanie : il s'agissait d'une jeune femme présentant une névralgie du trijumeau très rebelle à toute thérapeutique : elle n'avait pratiquement pas pu s'alimenter depuis trois jours. Or, si la calcémie totale (méthode de PATTON et REEDER) ainsi que le Ca^{++} dialysable étaient *normaux*, le *magnésium sérique*, par contre, était à 12,5 mg/l, ce qui constitue à peu près la moitié du chiffre normal, ce dernier allant de 20 à 24 mg l, soit 2 mEq/l. MAURAT [91], dans une étude très détaillée, rapporte 3 cas de tétanie, chez le jeune enfant, avec des taux allant de 12 à 15,6 mg l, mais avec des chiffres de calcium total également très bas : de 47 à 74 mg/l. Tel n'était pas le cas de notre malade qui avait un calcium total à 105 mg/l. Le chiffre de 1 mEq/l de Mg^{++} représente certainement une *perturbation métabolique importante pouvant rendre compte d'une hyperexcitabilité neuro-musculaire* [40]. A ce propos, notons en passant qu'on connaît très mal la répartition du magnésium sérique : on sait qu'à l'image du calcium il se trouve inégalement réparti en deux fractions, l'une liée aux protéines et l'autre *libre*. Nous n'avons trouvé aucun travail important sur le dosage du Mg^{++} ultrafiltrable (ou dialysable). J. LÉVY [85, 86], sur une petite série de dosages, a trouvé des variations de 47 à 74 %. MAURAT cite le chiffre de 65 à 85 %. Il semble bien que :

$$\frac{(Ca^{++})}{(Mg^{++})} = \frac{(\text{Calcium protidique})}{(\text{Magnésium protidique})}$$

mais une différence fondamentale existe entre les deux : les *hématies* pratiquement dépourvues de calcium, contiennent au contraire trois fois plus de magnésium que le plasma, d'où la nécessité d'éviter toute hémolyse en cours de dosage. Il semble, en fait, que le Mg^{++} dialysable représente moins de 10 mg/l : nous avons été amenés, en effet, à le doser plusieurs fois sur le dialysat pour éliminer toute interférence.

D'autres travaux suggèrent enfin que la tétanie est peut-être plus due à une diminution du rapport Ca protéique/Ca dialysable qu'à

une chute de la fraction dialysable ou ionisée, si l'on préfère cette terminologie.

Au problème de la tétanie se rattache celui de certaines épilepsies [70], comme celui des troubles mentaux d'origine parathyroïdienne [27]. La constatation de signes d'hyperexcitabilité neuro-musculaire au cours des névroses d'angoisse — ou même des grandes dys-tonies neuro-végétatives — nous paraît mériter une étude : des variations assez nettes de la calcémie totale ont été notées par divers auteurs, soit au cours de syndromes, soit au cours de thérapeutiques psychiatriques.

GLASER [48], au cours des années 1924-1925, opposait déjà la remarquable constance de la calcémie chez les sujets normaux à l'instabilité de celle-ci au cours des états névrotiques. Il notait que le fait de « tranquilliser » un anxieux pouvait amener une baisse parfois considérable de la calcémie (par exemple : de 105 à 84 mg l). Il concluait que les variations du tonus du système neuro-végétatif agissent sur la calcémie par l'intermédiaire du sympathique, provoquant une concentration du calcium dans le milieu tissulaire.

TOMASSON [149] observait le même phénomène, soulignant sa particulière netteté au cours des psychoses maniaco-dépressives, la manie s'accompagnant d'hypercalcémie et la dépression d'hypocalcémie.

KRETSCHMER et KRUGER [80] font les mêmes constatations, tout comme EHRSTROM [35] qui note la chute du taux du calcium sanguin durant le sommeil naturel ou artificiellement provoqué par les barbituriques.

BRAUCHLI et SCHNIDER [7] mènent l'expérience inverse : le calcium sanguin s'élève chez les chiens excités par de fortes doses de caféine. Mais la narcose ramène le taux du calcium à la normale, ou même l'abaisse.

Plus près de nous, H. et G. LABORIT, reprenant l'hypothèse de CLOETTA, pensent que le calcium sanguin se fixe sur le tissu nerveux dans tous les états de narcose ou de sommeil. Ils apportent à l'appui l'hypercalcémie habituellement constatée au cours des hibernations, avec élévation du rapport Ca K. Pour reprendre leurs termes mêmes : « Le calcium isole la cellule du milieu qui l'entoure, il imperméabilise la membrane cellulaire » [82].

Les paralysies secondaires à des troubles métaboliques, les dyskaliémies entre autres, constituent aussi un large terrain de recherches en raison de l'antagonisme prouvé de K^+ et Ca^{++} .

Toutes les dysprotéïnémies s'accompagnent d'une perturbation de la répartition calcique [58]. Ici aussi, les informations sur la fraction non liée aux protéines demeurent rares.

Un dosage effectué fortuitement chez une malade porteuse d'une ostéoporose dite sénile (hospitalisée pour fracture du col du fémur), nous a révélé un Ca^{++} dialysable nettement inférieur à la normale, alors que le calcium total était normal. La répartition calcique du plasma est probablement le témoin des échanges entre la réserve, c'est-à-dire le tissu osseux, le milieu intérieur, et les sorties urinaires ou intestinales [106].

Bien d'autres variations pathologiques du Ca^{++} , notamment en pathologie rénale, ont été avancées, mais le plus souvent à titre d'hypothèses, hormis les cas étudiés par SOULIER et CROSNIER. Logiquement, la concentration en Ca^{++} dialysable du liquide d'œdème, de l'ascite (mécanique) et du sérum d'un malade devraient être identiques [47].

Seul un très grand nombre de mesures, voire d'épreuves fonctionnelles basées sur le dosage de la fraction calcique libre, pourront délimiter exactement la part du Ca^{++} dans ces divers troubles, et dire si cette fraction varie parallèlement ou non au calcium total du plasma.

Il sera également utile de savoir si le Ca^{++} dialysable du L.C.R. et celui du sérum ont un rapport constant, ou si celui-ci varie : il y a peut-être là une occasion d'évaluer la barrière hémoméningée, que l'on connaît encore mal.

Peut-être pourra-t-on enfin étudier, selon une méthode décrite plus loin (la polygraphie sous contrôle biochimique), les corrélations entre le taux du calcium « libre » et l'électro-encéphalogramme. De très nombreux travaux ont été faits ces dernières années sur calcium et E.E.G. : citons l'étude de 23 cas de tétanie dans la remarquable thèse de WACKENHEIM [156], étude reprise par THIÉBAUT et ses collaborateurs [146]. Il a semblé à ces auteurs que, pour un même sujet, la fréquence des rythmes cérébraux était directement proportionnelle au chiffre de la calcémie. Le « seuil critique » pour lequel les altérations apparaissent, semble varier d'un sujet à l'autre, comme pour l'hypoglycémie : nous avons personnellement fait la même constatation en ce qui concerne la sensibilité des sujets à l'insuline par voie veineuse [155]. Le chiffre de 70 mg/litre est cependant avancé comme limite habituelle.

Les manifestations spécifiquement épileptiques feraient suspecter le caractère neurogène d'une tétanie : les convulsions tétaniques parathyréoprives ne s'accompagnent pas d'anomalies électriques spécifiques de comitialité.

L'hyperpnée constitue en tout cas le meilleur procédé pour activer le tracé [130, 156].

En ce qui concerne les tétanies dites « normocalcémiques », les opinions divergent : tracé souvent normal [156] ou au contraire généralement altéré [130].

GOLDBERG, très récemment [49], a suggéré que le rôle du calcium dans l'apparition des crises convulsives chez des sujets hypocalcémiques était peut-être surestimé. Nous espérons que le contrôle continu de la fraction diffusible (donc le Ca^{++}) apportera quelques précisions sur ces problèmes si passionnants. Celui-ci se heurte toutefois à des problèmes techniques non encore résolus : il faudrait pouvoir pratiquer le dosage sur plasma, donc disposer d'un système de centrifugation adapté aux dosages en continu. Nous croyons savoir qu'un tel appareillage est actuellement à l'étude aux U.S.A. En effet, on verra plus loin pourquoi le dosage en continu sur sang total est impossible sans dilution importante.

Le dosage du calcium non protéique par dialyse

« L'absence d'une méthode commode (convenient) d'ultrafiltration est responsable du petit nombre d'investigations sur le calcium ultrafiltrable, qui se trouve être approximativement le calcium ionisé. » (PRASAD et FLINK [120].)

En effet, parmi les nombreux travaux publiés jusqu'à ce jour, nous n'en avons trouvé aucun qui apporte un nombre important de dosages (plus de cent) permettant de donner une répartition (histogramme) de la fraction libre, qu'on l'appelle ionisée, diffusible, ultrafiltrable ou dialysable. Seuls SOULIER et CROSNIER donnent des limites précises à leur dosage : $57 \text{ mg/l} \pm 2$, ce qui laisse entendre que les $2/3$ des sujets normaux ont un Ca^{++} entre 55 et 59 mg/l. C'est là une répartition très étroite si on la compare à celle admise pour le dosage du calcium total, quelle que soit la technique utilisée, et qui est : $100 \pm 5 \text{ mg/l}$.

I. — PRINCIPE DE LA DIALYSE

Nous rappellerons en quelques lignes ce qu'on entend par dialyse, cette définition justifiant la méthode qui nous semble proche des phénomènes biologiques observés chez l'individu normal.

Il existe des membranes à travers lesquelles les colloïdes ne peuvent diffuser, alors que les cristalloïdes les traversent jusqu'à égalisation de leur concentration de part et d'autre de la membrane. Les membranes utilisées actuellement sont généralement en cellophane, et leurs caractéristiques très exactement définies. La plupart des expériences antérieures à ces dix dernières années l'ont été avec des collo-

dions. La fabrication d'un sac de collodion est toujours délicate : elle ne saurait donner une certitude quant à la régularité des pores, ni quant à une épaisseur constante du sac.

La dialyse a surtout été utilisée en chimie organique, dans un but exactement opposé au nôtre : obtenir une solution protéique pure débarrassée des sels minéraux [68].

Les lois physiques réglant une dialyse sont encore mal connues, quoi qu'elles aient fait l'objet d'un récent congrès [22]. Pour les schématiser à l'extrême, on peut dire que la vitesse et la qualité d'une dialyse dépendent :

- 1) Des caractéristiques de la membrane : surface, épaisseur, diamètres des pores, nature chimique (donc charge électrique).
- 2) Du milieu de contre-dialyse.
- 3) De la température ambiante.
- 4) De l'agitation du dialysant et du dialysat.
- 5) De la nature et de la concentration de l'élément dialysant.

* *

1) Plus la surface de dialyse est grande, plus la membrane est mince, plus les échanges sont rapides. Plus le diamètre des pores est fin, plus la dialyse sera élective, mais plus les risques de colmatage des pores seront grands. Ce dernier fait conduit souvent à diluer les prélèvements afin de faciliter leur dialyse, tout en diminuant la concentration en colloïdes, les protéines, ici. Le plasma pur dialyse, mais pas le sang total.

2) Lorsqu'on effectue une dialyse contre de l'eau pure, la présence de quantités très souvent importantes de sels minéraux dans le liquide à dialyser entraîne une grosse différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane : le départ des sels minéraux provoque l'entrée massive d'eau à l'intérieur du dialysant (afflux endosmotique) qui risque de perturber l'équilibre protéique : nous avons rejeté rapidement l'emploi de l'eau bidistillée comme liquide de contre-dialyse car on obtenait des taux de Ca^{++} trop importants, mais surtout variant irrégulièrement d'un sérum à l'autre, vraisemblablement selon la concentration en protides. Le sérum physiologique isotonique, préparé avec eau bidistillée et ClNa pur pour analyses, nous paraît constituer le milieu idéal. VON MEYSENBERG [99] et RONA ont même réalisé de véritables Ringer sans calcium, selon le principe de la dialyse dite de compensation.

3) La température de la dialyse joue un rôle important, ainsi que l'évoque la courbe ci-dessous, établie pour le glucose :

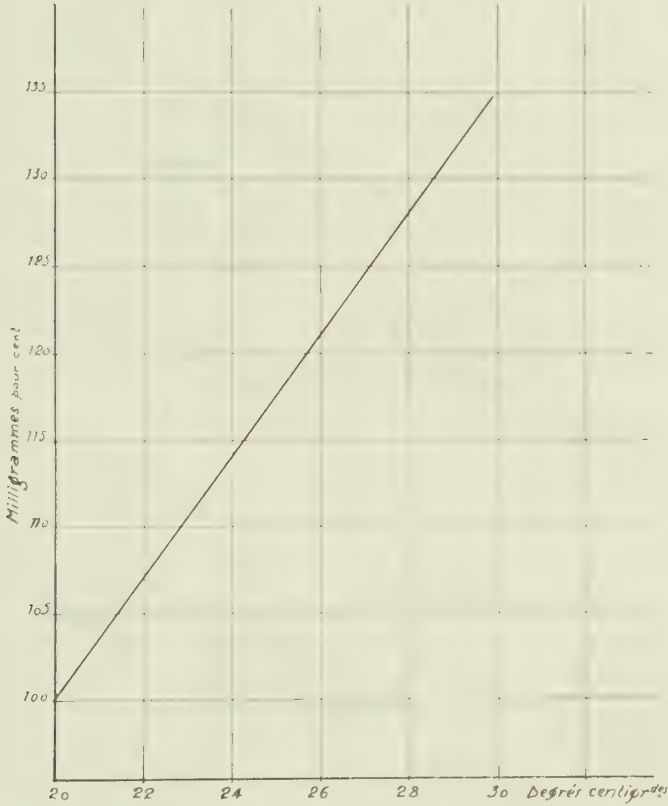


Figure 1

Courbe de dialyse du glucose en fonction de la température

Cette courbe, établie avec la membrane utilisée pour notre dosage, montre que la dialyse est accrue par l'élévation de température dans certaines limites. Mais il y a plus important : opérer à la température du corps semble une condition indispensable pour un dosage exact. TORIBARA [150] a montré qu'il se forme, à basse température, des complexes calciques diffusibles mais non ionisés, qui élèvent donc le pourcentage du calcium ultrafiltrable : à 36°, il recueille 65,9 % du calcium total, et à 10°, 75,2 %.

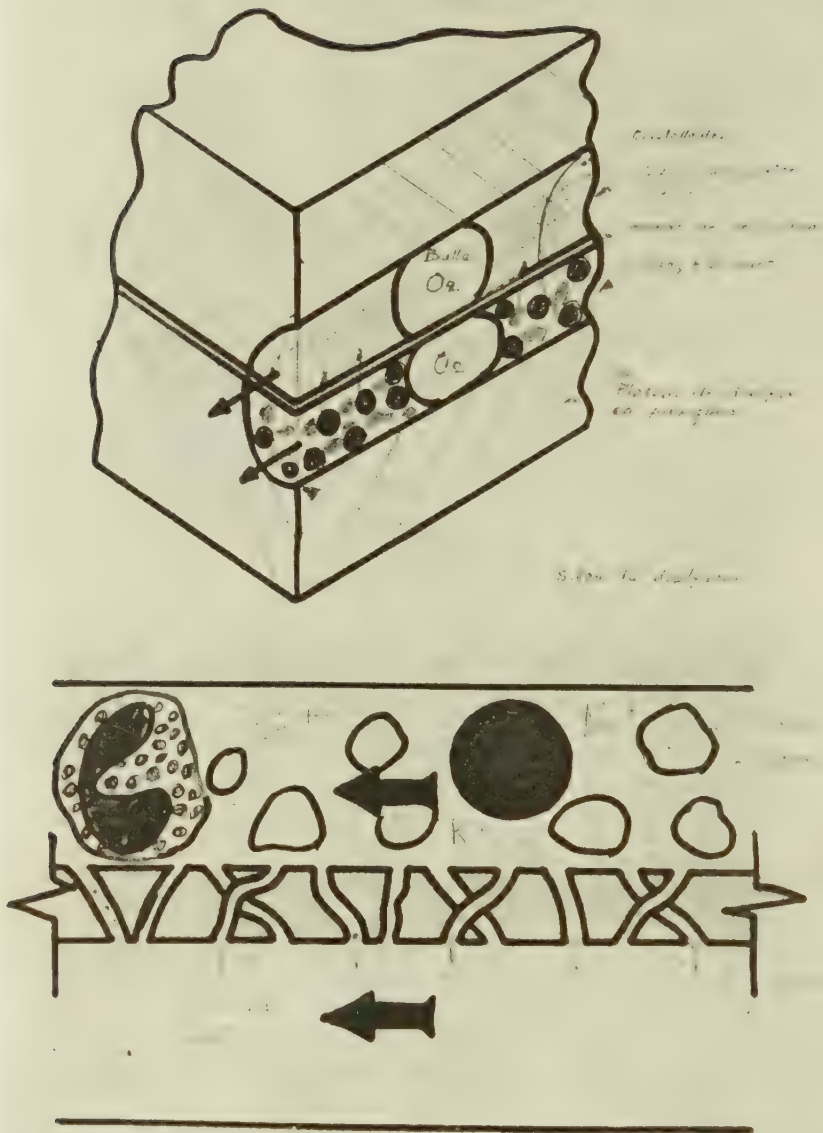


Figure 2
Principe de la dialyse

4) L'agitation du dialysant et du dialysat est une condition importante : toutes les techniques récentes comportent soit une rotation [116], soit une centrifugation [150].

Dans la technique que nous utilisons, le dialysat est fragmenté en très petites fractions qui circulent très vite sans interruption dans une sorte de spirale, tandis que le liquide de contre-dialyse circule légèrement plus rapidement vis-à-vis de lui, dans le demi-sillon correspondant.

5) Enfin, le pourcentage de dialyse est une fonction linéaire continue de la concentration en éléments dialysables.

II. — ULTRAFILTRATION ET DIALYSE

Ultrafiltration et dialyse sont employées souvent indistinctement et indifféremment [4]. Nous avons vu que la dialyse est la traversée d'une membrane par des molécules quelles qu'elles soient et quelle que soit la vitesse de passage, avec une pression égale des deux côtés de la membrane.

L'ultrafiltration retient des particules colloïdales (alors qu'on peut dialyser sans retenir, mais pour équilibrer des concentrations); elle est généralement effectuée sous pression. Cette technique a été largement utilisée pour isoler la fraction calcique non liée aux protéines, avec les appareillages classiques de BLUM et DELAVILLE [6] ou GRABAR [50] en France, de CUSHNY [25], GROLLMAN [54] ou GIEMSA [in 85] à l'étranger. Certes, l'application d'une pression empêche le reflux endosmotique, donc la dilution du liquide dialysant. Mais, NEUHAUSEN et PINCUS en font une critique dès 1923 [104], on ne peut s'autoriser à dépasser la pression systolique, soit 120 à 150 mm de Hg, sous peine de dénaturer les structures protéiniques et donc de libérer progressivement la quasi-totalité du calcium protéique. Rappelons que certains (BURIAN) ont effectué des ultrafiltrations sous dix atmosphères, ce qui avait amené d'autres à parler de la fraction « très solidement complexée » [105], conditions s'écartant tout à fait de la physiologie humaine.

Ainsi, la dialyse menée à la température du corps, en milieu isotonique au sang, en pH physiologique, nous paraît-elle une méthode d'analyse relativement proche des conditions de la vie cellulaire : toutes ces raisons, ajoutées à quelques autres touchant aux avantages techniques, nous l'ont fait retenir.

III. — DESCRIPTION ANALYTIQUE DE LA MÉTHODE

Elle est basée sur une utilisation originale de *l'auto-analyseur Technicon*. Cet appareil, connu et utilisé aux U.S.A. depuis quatre ou cinq ans, est couramment employé pour effectuer en grande série des dosages courants, tel celui du glucose ou de l'urée. De nombreux hôpitaux parisiens en sont d'ailleurs dotés. Nous avons mis au point cette technique, d'une part, à la Pharmacie centrale de la Salpêtrière¹, d'autre part, à la Clinique Sainte-Anne². Elle est la suivante :

a) PRÉLÈVEMENTS

Les dosages ont été effectués à partir de sérums ou de plasmas provenant du laboratoire de sérologie ou de malades hospitalisés. Dans une deuxième phase, des essais ont été effectués sur sang total recueilli sur héparine sèche, en flacons hermétiques.

La quantité nécessaire est de 1 à 2 ml pour un dosage. Il est préférable de disposer d'un prélèvement de 2 à 4 ml, afin de contrôler éventuellement le résultat s'il est anormal. Si on opère sur sérum, il faudra donc 6 à 8 ml de sang ; comme on pratique souvent le calcium total en même temps, il faut en pratique 10 ml. Les prélèvements sont disposés sur un plateau automatique où ils sont pompés sur le rythme de 20 par heure. Il est indispensable d'intercaler entre chaque prélèvement un godet de sérum physiologique : l'avantage de cette pratique est, d'une part, l'assurance d'une non-contamination d'un échantillon à l'autre, et d'autre part, la possibilité d'un contrôle de la colorimétrie entre chaque dosage, précaution pratiquement obligatoire avec la murexide. Le seul inconvénient est de limiter le rendement à dix dosages par heure, lorsque l'appareil est étalonné. Chaque prélèvement est pompé rythmiquement par la pompe proportionnante selon un débit variable (par exemple, 0,42 ml par minute) pendant deux minutes.

(1) Prof. GERMAN, Laboratoire de Chimie biologique : A. GALLI et J. JEANMAIRE.

(2) Prof. Jean DELAY, Laboratoire d'E.E.G. : G. VERDEAUX.

b) SEGMENTATION ET DILUTION

Aussitôt pompés, les prélèvements sont segmentés par de l'air et mélangés, en proportion constante, à un diluant. Nous avons toujours employé un tampon à pH 7.4 lorsqu'il s'agissait de sérums prélevés depuis plusieurs heures et ayant été laissés à l'air libre, donc devenus alcalins. Le problème est différent s'il s'agit de plasmas récemment recueillis : on peut utiliser alors le sérum physiologique.

Nécessité d'un tampon :

En effet, la répartition du calcium dépend largement, on l'a vu, du pH du milieu, ainsi que l'ont démontré divers expérimentateurs :

— DILLMAN et VISSCHER :

— à pH 7 : 59 % de Ca ultrafiltrable

— à pH 7,6 : 45 % »

— PRASAD et FLINK :

— 7.3 à 7.7 : 53,3 % $\pm$ 2,48

— sous CO₂ : 65,3 % $\pm$ 4,35

TORIBARA [150] donne le tableau suivant :

Température de l'ultrafiltration	pH	Ca total (mg %)	Ca ultrafiltrable (mg %)	% du Ca Uf
36°	7,68	9,51	6,41	67,4
36°	8,22	9,51	5,28	55,6
36°	6,35	9,4	8,05	86,8
36°	7,51	9,4	6,18	66,7
36°	6,35	9,27	8,6	91,5
36°	8,18	9,27	5,38	57,3
36°	7,68	11,57	8,34	72,2
36°	8,22	11,57	6,96	59,3
23°	6,52	10,15	9,28	91,4
23°	7,63	10,15	7,76	76,4
23°	8,40	10,15	5,82	57,3
23°	7,56	9,89	7,48	75,7
23°	8,37	9,89	5,67	57,3
10°	7,44	11,57	9,30	80,3
10°	8,14	11,57	8,13	70,3

(soit, au pH physiologique, environ 65 %, et à 8.2, environ 55 %).

— VON MEYSENBURG, opérant sous pression variable de CO_2 , trouve avec deux liquides de contre-dialyse différents (A et B) :

	Liquide A	Liquide B
A pH 7,2		70 %
A pH 7,3	73 %	
A pH 7,6	67 %	67 %

La différence de composition des deux liquides est importante : A est hypertonique, B est à peu près isotonique ; et pourtant, les chiffres de calcium dialysable (sans qu'on précise s'il est ionisé ou non) sont dans la même zone si le pH est identique : le pH a certainement plus d'importance que la composition du liquide de contre-dialyse, c'est pourquoi nous nous sommes tenu à un liquide simple, isotonique, le sérum physiologique.

— Les études de HOPKINS sont encore plus édifiantes :

	% de Ca ultrafiltrable		% de Ca ultrafiltrable
— A pH 5,1	97	— A pH 7,63	71
— 7,26	75	— 7,71	66
— 7,36	75	— 7,83	64
— 7,47	75	— 8,28	52
— 7,50	73	— 9,9	30

Et, plus récemment, POULOS [116] a rappelé dans un tableau synoptique (ci-après) les variations de la proportion de calcium qui dialyse, en fonction du pH, et compte tenu de la protéinémie (tableau établi sur deux plasmas).

Les études par ultrafiltration aboutissent aux mêmes conclusions : dans l'acidose (réalisée expérimentalement par CINH_4), élévation de la fraction ultrafiltrable, et phénomène inverse au cours de l'alcalose (après prise de bicarbonate) où l'on atteint 57 à 63 %, au lieu du chiffre normal : 77 % [134 bis].

Telle était d'ailleurs l'hypothèse de départ de RONA et TAKAHASHI, qui fut ensuite confirmée par BRINKMAN [9]. Le départ du CO_2 sanguin, qui élève rapidement le pH de tout sérum prélevé et laissé au contact de l'air, diminue nettement le pourcentage du Ca^{++} dialysable, également. Nous avons effectuée une série de dosages sans tampon véronal, en diluant des sérums datant de vingt-quatre heures avec du sérum physiologique, ce qui abaissait pourtant déjà leur pH,

Protéines du plasma (g %)	A pH = 7		A pH = 7,4		Variations du Ca dialysable	Δ dial. Ca	
	Ca du plasma (mg %)	Ca dialysable (%)	Ca du plasma (mg %)	Ca dialysable (%)		Δ 0,1 pH (%)	Δ pH (m Ca/l)
5,02	10,59	79,7	11,14	73,2	— 6,5	— 1,6	— 0,2
	10,34	83,4	10,99	73,7	— 9,7	— 2,6	— 0,32
	16,96	80,7	17,38	76,4	— 4,3	— 1,1	— 0,14
	30,13	77,3	30,73	74	— 3,3	— 0,8	— 0,37
	30,30	78,7	30,73	73,7	— 5	— 1,2	— 0,75
6,38	6,22	67,3	6,52	58,6	— 8,7	— 2,2	— 0,22
	12,74	71,4	13,69	63,7	— 7,7	— 1,9	— 0,24
	26,64	73,4	27,46	67,5	— 5,9	— 1,4	— 0,64
Moyenne :						— 1,6	— 0,36

celui du sérum physiologique variant entre 4,5 et 5. Le pH moyen de cette série de prélèvements était de 8 à 8,2. Or, tous les chiffres de Ca^{++} dialysable se situaient entre 48 et 54 mg/l, tout en donnant un profil de répartition semblable à celui obtenu avec un tampon $\text{pH} = 7,4$.

MC LEAN et HASTINGS supposent qu'à une augmentation de pH de 0,25 correspond une diminution d'environ 0,09 de Ca^{++} , ce qui conduit à la relation :

$$\Delta \text{Ca}^{++} = -0,36 \Delta \text{pH} [4]$$

Un autre avantage du tampon est d'éviter la libération continue d'ions Ca^{++} en raison de la modification due aux passages d'ions libres dans le liquide de contre-dialyse, d'où tendance à l'abaissement régulier du pH du liquide dialysant. Enfin, ainsi qu'on vient de le dire, le pH du liquide de contre-dialyse est bas, ce qui justifie encore la présence du tampon pour opérer dans des conditions stables et constantes.

Le tampon véronal (mélange de deux solutions 0,1 M) peut être rendu isotonique au sérum très facilement par l'addition de 3 grammes de ClNa par litre — ce qui donne 300 mEq/litre.

Choix du tampon :

Un procédé simple pourrait consister à rétablir la pression de CO_2 en opérant sous atmosphère contrôlée (mélange de $\text{CO}_2 + \text{O}_2$). Il suffirait pour ce faire de fragmenter les prélèvements non plus par de l'air, mais par un tel mélange. Après essais, en segmentant les prélèvements par du carbogène au lieu de l'air, nous avons renoncé à cette technique en raison des irrégularités constatées quant au pH final : on ne peut absolument pas compter sur un même pH, d'un échantillon à l'autre, ce qui disperserait les résultats et rendrait impossible la comparaison d'un sérum à l'autre, pour les raisons qu'on vient de voir. Au contraire, un tampon liquide assure une dialyse à un pH constant, ou du moins dans une zone étroite.

Nous avons essayé de nombreux tampons, mais la plupart sans succès, car ils contiennent en général des acides se combinant au Ca^{++} que nous désirons mesurer intégralement : ainsi le classique tampon phosphate de Soerensen, les tampons citrique ou acétique, généralement proposés pour ramener un liquide au pH physiologique [108, 111].

Dans un premier temps, nous avons étudié un tampon physiologique (7,5-7,6) et isotonique ($\Delta = 0,56/58$) donné par HINSBERG-LANG [63] et ainsi composé :

— glycocolle : 6,80 grammes	}	dans 880 ml d'eau distillée
— ClNa : 4 grammes		
— CO_3HNa : 0,8 gramme		

le pH final étant ajusté avec environ 5 ml de NaOH 0,2 N. Ce tampon, quoique utilisable, est assez peu pratique, et c'est pourquoi nous l'avons abandonné. Il est délicat à préparer, et surtout à ajuster au pH désiré ; il varie d'un jour à l'autre, et doit donc être vérifié avant chaque emploi, pour une éventuelle correction du pH. Il nous a permis cependant un travail préliminaire portant sur 102 dosages, qui a délimité la constante recherchée et fourni une première répartition étalée de 54 à 64 mg/l avec une valeur moyenne de 59 mg/l.

C'est donc finalement sur le tampon de MICHAELLIS que notre choix s'est fixé. Il résulte du mélange :

— ClH 0,1 N	41,9 ml
— Véronal sodique 0,1 m	58,1 ml
(20,62/1)	

Ce tampon présente de très nombreux avantages sur le précédent : de préparation très simple, il est de conservation aisée au froid. Tout au plus, est-on amené à le filtrer de temps à autre si un précipité se forme, quitte à rétablir par quelques gouttes de ClH 0,1 N un changement d'équilibre léger qui se fait généralement dans le sens d'une alcalinisation.

D'autre part, nous savons, depuis les travaux de RAAFLAUB [121], que le *véronal* ne complexe pas le Ca^{++} , alors que nous ne possédons aucune donnée de cet ordre concernant le glycocolle, et que le bicarbonate, même en très faible quantité, semble perturber la répartition calcique.

En pratique :

1) il est impossible de se passer de tampon, si le prélèvement n'a pas été conservé à l'abri de l'air ou s'il a été effectué un jour plus tôt ;

2) Il faut savoir que même en utilisant ce tampon véronal, on ne peut espérer recourir exactement à 7,4. Des mesures systématiques montrent un pH moyen de 7,7.

c) LA DIALYSE

Sitôt le mélange du prélèvement avec le tampon effectué, celui-ci pénètre dans le plateau de dialyse où il entre en contact du sérum physiologique à travers la membrane.

Ce plateau de dialyse baigne dans un bain-marie maintenu en permanence à 38° (thermostat réglé pour l'intervalle 37°-38°) grâce à un agitateur égalisant la température des différentes couches d'eau.

Rappelons encore l'importance d'opérer à la température du corps humain, ainsi que le démontre le tableau de la page suivante, emprunté à TORIBARA [150] :

IMPORTANCE DE LA TEMPÉRATURE POUR L'ULTRAFILTRATION

Prélèvements	Température	Ca total	Ca UF	% de Ca UF
J...	3°5	9,36	7,96	85,1
	10°	9,36	7,41	79,2
	23°	9,36	6,96	74,3
	36°	9,36	6,51	69,6
B...	3°5	10,27	7,46	72,6
	10°	10,27	7,24	70,5
	23°	10,27	6,96	67,8
	36°	10,27	6,24	60,8
R...	10°	9,84	7,81	79,3
	23°	9,84	7,33	74,6
	36°	9,84	6,44	65,5
T...	10°	9,74	7,46	76,6
	23°	9,74	7,26	74,5
	36°	9,74	6,58	67,7

Les chiffres normaux sont donc :

- 65,9 % à 36° ;
- 73,9 % à 23° ;
- 75,2 % à 10°.

KATZ et KLOTZ ont par ailleurs montré que le captage du calcium par la sérumalbumine bovine n'était pas influencé par la température [73].

La pression régnant de part et d'autre de la membrane est d'environ une atmosphère. Les sillons concentriques (agitation, mélange et centrifugation) du plateau ont une faible dimension : 0,062" de large et 0,03" de profondeur, soit respectivement 1,57 mm et 0,78 mm. Leur longueur totale est de 2,20 mètres, ce qui donne une large surface de dialyse.



Figure 3
Le plateau de dialyse en place

La membrane semi-perméable utilisée est une cellophane Dupont (référence 300 PT 62), d'une épaisseur moyenne de 0,228 mm. La dimension des pores est de 25 à 35 Angströms (*). On est donc bien à l'échelle de la membrane cellulaire : à titre d'exemple, PALADE et PALAY, grâce au microscope électronique, ont pu évaluer à 50 Angströms l'épaisseur de la membrane neuronique, et les diverses communications faites au II^e Congrès International de Neurochimie donnent des chiffres du même ordre pour les différents constituants de la cellule nerveuse [125].

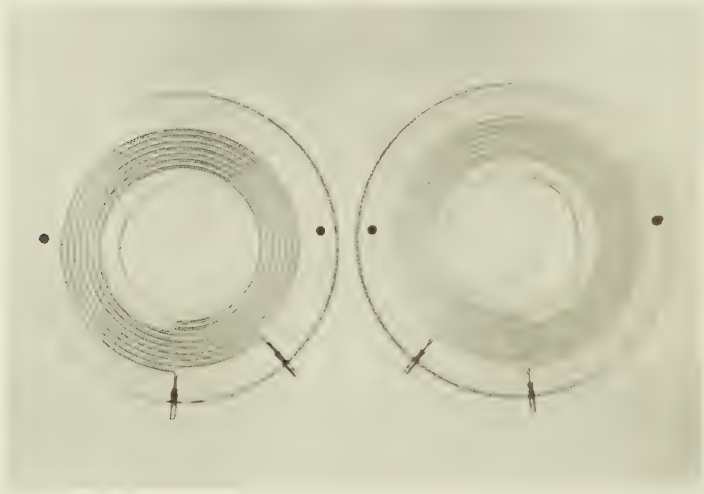


Figure 4

Plateau de dialyse ouvert

Il semble d'ailleurs, selon POLICARD et BAUD [113], qu'à l'échelle cellulaire on observe deux types de mouvements :

- la *filtration* (bulk flow), entraînement mécanique de molécules par un flux d'eau passant à travers une membrane dont les pores mesurent plus de 20 Angströms ;
- ou la *diffusion*, passage de molécules par leur mouvement propre à travers l'eau qui remplit les pores de moins de 20 Angströms.

(*) 1 angström = $1 \text{ cm } 10^{-8}$ soit un dixième de $m\mu$.

On se demande encore si la membrane cellulaire en général n'est pas un échangeur d'ions.

Le temps de dialyse est une constante de l'appareil : toujours le même, pour les solutions-étalons comme pour les prélèvements, à un débit donné. Avec notre montage, ce temps est de deux minutes (ce temps comprend le passage dans les deux bobines mélangeuses à 38°), quatre minutes s'écoulant entre chaque dialyse calcique : une minute pour passage d'air, deux minutes pour le passage du sérum physiologique-laveur, et une minute pour passage d'air avant le prélèvement suivant. Nous avons vérifié, avec des solutions contenant des quantités connues de Ca^{++} , le pourcentage de dialyse de cet ion, en si peu de temps : il semble être à peu près 50 %, comme dans le cas de l'urée (dosée par l'auto-analyseur selon le même principe) et à la différence du glucose dont 20 % seulement dialyse. Ceci n'a d'ailleurs qu'une importance secondaire, la lecture des courbes étant faite au moyen d'étalons ayant eux-mêmes dialysé suivant le même circuit.

L'entretien de la membrane demande évidemment certains soins : son montage doit être rigoureux. Elle doit être lavée comme l'ensemble des circuits, avant chaque série de dosages pour éliminer tout résidu calcique à sa surface : pour ce faire, on passe pendant dix à quinze minutes une eau acétique, puis, durant cinq à dix minutes, de l'eau *bidistillée*. A la fin de la série, on repasse de l'eau bidistillée durant le même temps.

On verra, sur la figure précédente, le plateau de dialyse et ses connexions : on remarquera la présence de bobines mélangeuses qui assurent l'homogénéité des liquides de part et d'autre de la membrane et les amènent à 38°. Tout cet ensemble plonge en effet dans un bain-marie à 38°.

Au total, il est certain que si l'on cherche à mesurer le Ca^{++} , c'est-à-dire le calcium ionisé plasmatique, il faut :

- 1) Utiliser un sang total recueilli une ou deux heures auparavant sur héparine sèche en flacon hermétique. Le centrifuger juste avant dialyse.
- 2) Ne pas diluer le plasma, ou le diluer au minimum (par exemple : 1,6 ml de plasma dilué avec 0,64 ml de sérum physiologique).
- 3) Dialyser le moins longtemps possible.
- 4) Dialyser contre le minimum de sérum physiologique : le débit du liquide de contre-dialyse doit être de 1,6 ml/mn au minimum. En dessous de ce chiffre, le retour à la ligne de base (entre chaque prélèvement) ne se fait plus, et on ne peut donc plus contrôler la stabilité de celle-ci.

d) DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU Ca^{++} SUR LE DIALYSAT

Tandis que la fraction protéique est rejetée avec environ la moitié de la fraction dialysable, l'autre moitié sort du dialyseur pour être mélangée aussitôt avec un réactif colorimétrique : le purpurate d'ammonium ou *murexide*, stabilisé à pH très alcalin soit par une base forte, soit par un système tampon spécial.

Etant donné le principe de l'auto-analyseur (analyse colorimétrique directe, en continu), les réactifs utilisables pour doser le calcium sont peu nombreux : toute précipitation préalable est écartée, par acide oxalique [79], chloranilique [43] — d'ailleurs délicate pour de faibles quantités — picrolonique, de même que toute complexométrie [32, 33]. Or, habituellement, on utilise une précipitation du calcium sous forme d'oxalate [21, 36] pour l'isoler du Mg, ce qui est indispensable, étant donné les affinités tinctoriales identiques de ces deux métaux, du même groupe chimique d'ailleurs : ce temps semble essentiel, et il est utilisé dans la méthode de référence (VELLUZ et DESCHASEAUX [154]) reprise par CHEYMOL dans sa thèse [19].

— La colorimétrie avec une solution alcaline d'acide 2-3-4 trihydroxybenzoïque, proposée par TSAO [151], n'est pas envisageable en raison du manque de stabilité du réactif qui doit être utilisé à l'abri de l'air : la solution de polyhydroxybenzène brunit en effet rapidement.

— La méthode à l'alizarine (hydroxy-anthraquinone de la garance) est indirecte et le temps de consommation demande vingt minutes pour apprécier une coloration [103].

— L'acide pyrogallol-2-3-4-carboxylique-I proposé en 1948 par OKAC, se colore en bleu-violet en présence des métaux alcalins, mais la sensibilité de la réaction ne dépasse pas 2 mg de Ca pour 100 ml.

On a cherché à utiliser directement les indicateurs complexométriques, eux-mêmes véritables « complexons » chélatant le calcium sous sa forme ionisée uniquement. Ont été essayés successivement aux U.S.A., le Noir Eriochrome, le Calcon et la Metallphtaléine [114] : mais cette dernière donne une coloration très instable, et surtout le Mg^{++} interfère de façon importante.

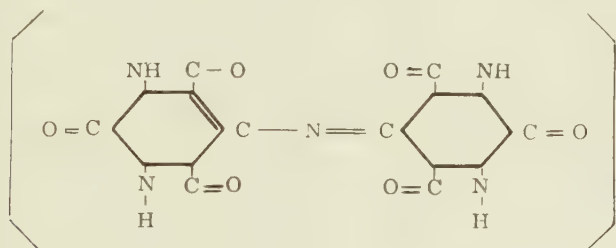
Nous avons, personnellement, essayé sans succès :

— Le réactif de PATTON et REEDER, dérivé naphthyl-azo-naphtalène, base de la colorimétrie complexométrique la plus couramment utilisée actuellement pour le dosage du calcium total du sérum.

— Le Plasmocorinth B, dérivé complexe de l'acide diazo-benzène-hydroxynaphtalène-disulfonique, proposé tout récemment à la suite de travaux japonais [160]. KINGSLEY et ROBNETT [74] ont cru enfin tenir le réactif colorimétrique *spécifique* du calcium, c'est-à-dire ne dosant pas Mg^{++} , en agissant en milieu très alcalin, avec de la soude normale. Il se forme ainsi une belle coloration pourpre, dont la lecture se fait à 615 $m\mu$. Valable pour un dosage complexométrique [77, 78], ce réactif colorimétrique ne nous a semblé *ni plus stable, ni plus spécifique* que la murexide. Rappelons qu'il est connu en Europe sous la dénomination de Bleu Eriochrome (GEIGY).

— C'est donc au purpurate d'ammonium (murexide) que nous nous sommes adressé.

La murexide est une poudre pourpre, assez hygrométrique, difficile à conserver (à l'abri de l'humidité et de la lumière), dotée d'un fort pouvoir colorant.



En solution aqueuse, ou hydro-alcoolique, à pH alcalin (supérieur à 10), elle est pourpre, tirant sur le violet plus le pH s'élève ; elle est jaune-rouge à pH 6 [32, 33]. Elle vire au rouge cerise en présence des métaux alcalino-terreux (Ca^{++} et Mg^{++}). Ainsi que le montre la figure suivante, extraite de l'étude très complète de WILLIAMS et MOSER [159], le purpurate de calcium formé a son maximum d'absorption vers 505 $m\mu$. Ces propriétés colorimétriques ont été signalées pour la première fois par BEILSTEIN, mais surtout développées en complexométrie (comme indicateur de fin de réaction) par SCHWARZENBACH [135, 136].

Stabilisation de la murexide :

Le principal problème posé par l'utilisation de la murexide est sa *stabilisation*. Sensible à la lumière, avant même sa dilution, la murexide

a la fâcheuse propriété d'évoluer également à la température de la pièce, toujours dans le même sens : vers une diminution de son absorption lumineuse ; ceci se traduit par une tendance très nette de la ligne de base à gagner le 100 % de transmission. Plus le pH est élevé, plus ce phénomène est rapide.

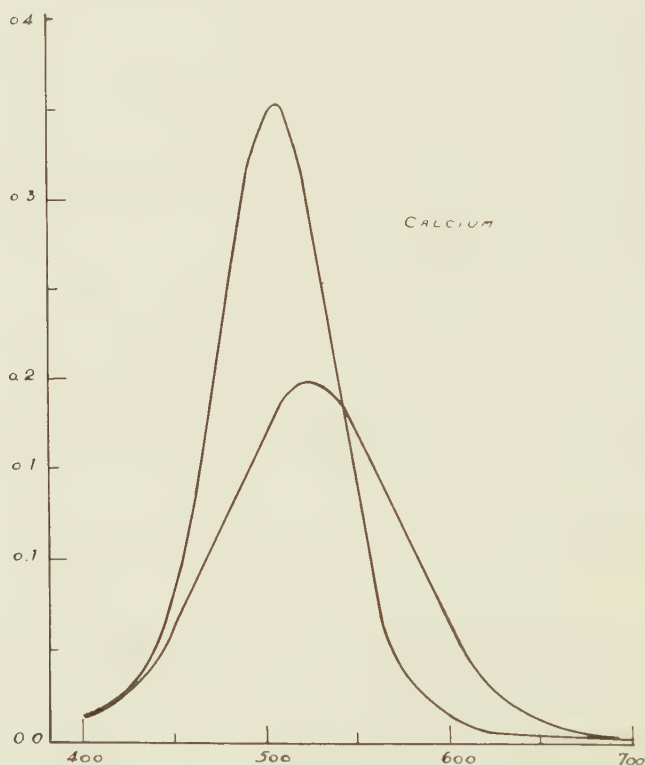


Figure 5

Spectre d'absorption de la murexide pure et de sa forme complexée avec le Ca^{++} (purpurate de Ca)

Le spectre d'absorption de la murexide a été diversement apprécié. Pour certains [121, 122], la murexide seule a son absorption maxima vers 530 mμ et le complexe murexide-calcium entre 480 et 500 mμ.

SMEETS et SEEKLES [139] conseillent d'opérer à pH 7,5 avec lecture à 480 m μ . Les traités classiques de chimie analytique minérale [131, 141] fixent la lecture optima à 505 m μ , à pH supérieur à 11.

SANDELL précise qu'on ne doit guère dépasser ce chiffre, limite d'une stabilité tout juste suffisante à la température de la pièce.

On a proposé divers artifices pour obtenir une stabilité colorimétrique meilleure : solution hydro-alcoolique, en proportions variables : 3 pour 7 [114] en général avec de l'alcool absolu. D'autres [28] remplacent l'éthanol par le 2-méthoxy-éthanol qui lui serait supérieur comme stabilisant : nous avons essayé ce dernier (connu sous le nom de méthylcellosolve), mais l'instabilité est nettement supérieure à celle de l'éthanol, contrairement au texte précité.

Nous avons suivi au photomètre l'évolution d'une solution hydro-alcoolique de murexide : nous avons comparé l'éthanol, le méthanol et l'isopropanol, sans noter de différences sensibles dans leur évolution.

Certains auteurs [20] diluent extemporanément une poudre de murexide amalgamée dans du CNa. D'autres ont recours à une solution saturée, également diluée extemporanément [144].

En fait, *le point le plus important semble être la conservation de la solution, saturée ou non, au frigidaire*. Sitôt sortie pour le dosage, elle doit être *mise dans la glace et y être maintenue durant tout le dosage* [20]. *Cette précaution nous a paru indispensable pour obtenir une ligne de base stable*, condition majeure d'une colorimétrie exacte et ceci durant plus de deux heures.

Le montage et les connexions des circuits doivent être vérifiés de très près avant chaque série de dosages : le passage d'une bulle d'air au contact de la murexide suffit à la colorer, d'où un artéfact positif, aisément identifiable d'ailleurs, mais pouvant perturber un dosage jusqu'à le rendre ininterprétable s'il se superpose exactement à lui : toutes les connexions des tubes de polyvinyle seront faites avec de la cyclohexanone, très hermétiquement.

Sensibilité de la murexide :

Elle est *considérable* et, selon certains [72], atteindrait 1 γ dans 5 ml à pH 12. Cette sensibilité extrême confine même au défaut. Elle oblige à vérifier avec grand soin toute la verrerie utilisée, l'eau bidistillée utilisée, et tous les réactifs. Nous avons été obligés de fabriquer le sérum physiologique, celui livré en flacons pour perfusion contenant des quantités notables de calcium. En pratique, avec notre technique d'étalonnage, la murexide permet d'apprécier très nettement *un milligramme par litre*, ce qui est très suffisant pour des

études cliniques. Un exemple d'enregistrement (solutions étalons, puis sérums) est reproduit plus loin, qui montre les différences colorimétriques importantes entre des concentrations de Ca^{++} de 5 mg %, 6 mg % et 7 mg %.

Cette sensibilité dépend, on l'a vu, du pH : les traités classiques conseillent de recourir à une base forte ou à un système tampon, à pH élevé (entre 11 et 12) pour amener la réaction dans les conditions souhaitées.

Le plus classique est le mélange (*) :

— Diéthylamine pure anhydre	200 ml
— ClH fumant	41,2 ml
— H_2O bidistillée	800 ml

Le mélange est fait dans un ballon de deux litres, réfrigéré, la diéthylamine étant ajoutée prudemment, par petites fractions, dans le mélange eau-ClH, en agitant, pour éviter tout dégagement de chaleur excessif qui pourrait être dangereux. Ce tampon alcalin amène le dosage à un pH final de 11,9. Il est ajouté à la solution hydro-alcoolique de murexide à parties égales.

— Tous les essais avec une soude concentrée ou un tampon à pH 13, type Soerensen, s'ils élevaient nettement le pH, donc accroissaient la sensibilité, ont amené une instabilité permanente de la ligne de base (qui équivaut, pour l'auto-analyse au blanc-réactif), sans doute en raison de l'évolution accélérée de la murexide.

— Nous avons d'abord adapté, pour l'auto-analyseur, la technique de TAMMELIN et MORGENSEN [144], reprise par HARPER [59]. On part d'une solution saturée de murexide conservée dans la glace, qui est diluée extemporanément (1 partie pour 25) par mélange avec la solution basique :

— Pipéridine	7 ml
— H_2O bidistillée, qsp	1.000 ml

La stabilité de la ligne de base colorimétrique apparaît ainsi très satisfaisante, pour un pH final de 11,6.

— Nos récents essais ont utilisé une base de préparation très simple : KOH à raison de 4 grammes par litre. Son utilisation nous semble la plus avantageuse à tous points de vue : sa préparation est très aisée, le pH final est amené à 12,5, d'où une très grande sensi-

(*) Conseillé par Technicon.

bilité et l'élimination du Mg^{++} ; surtout, la stabilité obtenue est excellente, sous réserve naturellement de garder la murexide dans la glace, comme il a été dit. Dernier avantage : KOH absorbe le CO_2 des bulles d'air parasites et minimise donc l'artéfact possible. Nos derniers essais utilisent de la potasse à 10 g/litre. Le pH final atteint toujours 12,9 ou 13 : on peut affirmer qu'à ce pH, il n'y a pas d'interférence du magnésium, interférence pratiquement négligeable d'ailleurs si l'on utilise une potasse à 4 g/litre. À pH = 13, la murexide prend une teinte violet foncé qui peut rendre le réglage de l'appareil (en général sur 90 % de transmission) difficile avec une cuve ordinaire de 6 mm. L'emploi d'une cuve plus petite constituerait certainement un progrès et éviterait l'obligation qu'on a parfois de diluer la solution de murexide (à 100 mg/litre). Cette dilution diminue, on s'en doute, la sensibilité de la réaction.

Au cours d'une série d'essais, nous avons essayé de dialyser les plasmas ou les sérums contre le tampon véronal isotonique : cette pratique, sans intérêt en ce qui concerne le pH final de dialyse, a pour inconvénient d'abaisser le pH de la réaction colorimétrique, donc de nuire à sa spécificité.

Spécificité de la murexide :

Deux notions sont capitales pour l'emploi de la murexide :

- 1) La murexide ne dose le calcium que sous la forme ionisée (Ca^{++}). Ceci est établi par de nombreux travaux [121, 128].
- 2) La murexide, sauf à pH supérieur ou égal à 12, dose une faible fraction du Mg^{++} .

Il faut naturellement tenir compte de cette interférence possible pour interpréter les résultats. On admet qu'à pH 12 et au-dessus, tout le magnésium est précipité sous forme de $Mg(OH)_2$ qui n'est pas dosée par la murexide. En fait, contrairement à ce qu'affirment divers analystes [121], on dose toujours un peu de magnésium, sauf à pH 13, tant est grande la sensibilité de la murexide : ceci justifie l'emploi d'une base forte, de préférence au système tampon proposé plus haut.

OSTERTAG et RINCK [107] ont proposé de saturer la murexide de Mg^{++} jusqu'à une concentration dite « indifférente », au delà de laquelle on ne dose plus le magnésium. Applicable à l'industrie, ce procédé est trop peu sensible ($1/10^6$ de mg, au mieux, dans 13 ml de prélèvement) pour l'être en biologie humaine.

Nous avons dosé le Mg^{++} sur le dialysat et sur le sérum avant dialyse. Nous n'avons trouvé, dans le dialysat, que de très petites

quantités de Mg^{++} (dosage par le jaune titane, selon la technique de KOLTHOFF), ne dépassant guère un milligramme : ceci suggère, compte tenu de la dilution et de la dialyse, que la fraction de Mg^{++} dialysable ne serait que de 5 à 10 mg environ. Cette constatation fortuite, différente des données classiques, mériterait une étude approfondie : la majeure partie du Mg^{++} est-elle liée aux protéines, ou le Mg^{++} dialyse-t-il très mal ?

Enfin, la murexide serait légèrement influencée par Cu^{++} et Fe^{+++} , mais en proportions trop faibles pour gêner le dosage, dont l'appréciation ne dépasse pas le milligramme.

Comme nous l'avons dit plus haut, l'utilisation d'une potasse (4 g ou 10 g/litre) à volume égal à celui de la murexide amène le pH final de la réaction colorimétrique entre 12,5 et 13. Toute possibilité d'interférence du magnésium est alors éliminée, ce que nous avons confirmé en dialysant des solutions de Cl_2Mg à des concentrations allant de 5 à 50 mg par litre : non seulement la murexide y apparaît très peu sensible (4 à 5 %), mais aussi et surtout le virage colorimétrique faible est le même quelle que soit la concentration de Mg^{++} . Pour encore plus de sécurité, nous avons préparé, outre des solutions-étalons de Ca^{++} pur, des solutions contenant Ca^{++} et une concentration uniforme de 5 mg/l de Mg^{++} . Or, on n'enregistre aucune différence, en ce qui concerne l'étalonnage, entre la solution calcique pure et la solution contenant $Ca + Mg$: ce problème semble donc résolu.

Lecture des résultats :

L'auto-analyseur est étalonné avant chaque série de dosages au moyen de solutions titrées de Cl_2Ca ainsi préparées :

— Carbonate de calcium	2,50 g
— ClH , pour dissoudre	14,5 ml
— $ClNa$	58,45 g
Eau bidistillée, qsp	2.000 ml

Cette solution-mère contient 0,5 mg de calcium par ml.

Elle est conservée au frigidaire en flacon hermétique et sert pour préparer les solutions-étalons de temps à autre, par petites quantités (25 ml, par exemple), pour éviter leur altération. De l'étalonnage exact dépend la lecture exacte des courbes.

Les ingénieurs de Technicon nous ont conseillé la dilution de la solution-mère avec une solution demi-molaire de $NaCl$ (29,225 grammes) : la présence de la solution de 0,5 M de $ClNa$ serait justifiée

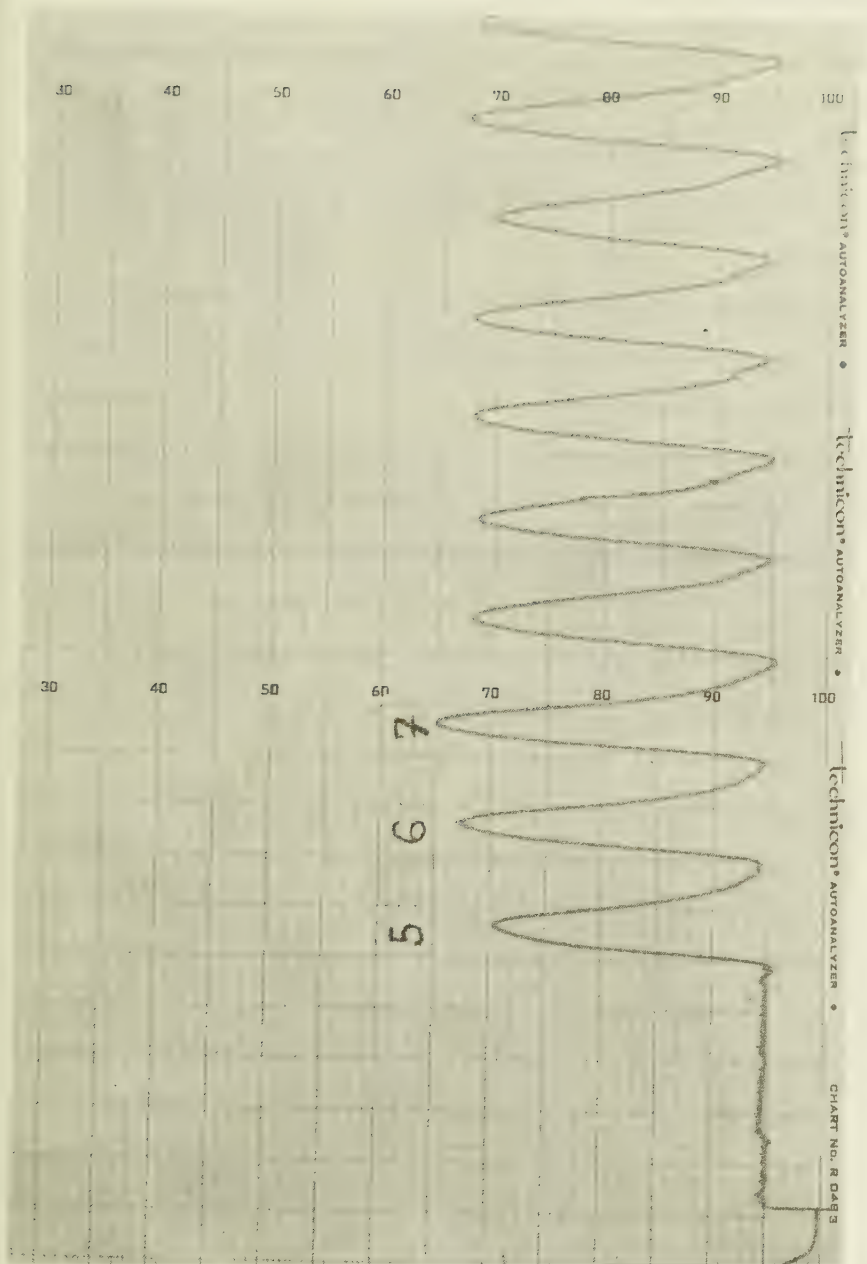


Figure 6
Exemple d'étalonnage et de dosages du Ca^{++} sur sérum

par une raison osmotique : le pourcentage de dialyse d'une solution aqueuse simple serait supérieure à celui du sérum, et la surcharge en sodium a pour but de compenser la force osmotique des protéines du sang.

En fait, après de multiples essais comparatifs avec des solutions-étalons isotoniques (dilution de la solution mère avec du sérum salé isotonique), nous n'avons observé *aucune différence d'étalonnage*, et adoptons donc le principe le plus simple comme le plus rationnel : l'isotonicité.

Le dosage des solutions étalons, dont le pH est naturellement très bas, autour de 4, est fait dans les mêmes conditions que celui des sérums, c'est-à-dire avec le même diluant, contre du sérum physiologique.

On étalonne en général avec les concentrations de 4, 5, 6 et 7 mg % lorsqu'on dose des sérums. Sur sang total, on utilisera les étalons 3, 4 et 5 mg %, puisque le dosage est dans ces limites. On reporte les points ainsi obtenus sur un calque en plexiglass, on trace la ligne les joignant, et on lit les pics donnés par les sérums en déplaçant le calque sur les enregistrements.

Etant donné la possibilité de variations de la ligne de base, on repasse, tous les dix dosages, un étalon « moyen », par exemple le 5 (50 mg/l). Cette précaution, qui évite toute erreur de lecture, nous semble pratiquement superflue avec KOH et murexide maintenue dans la glace.

Photomètre et enregistreur :

Sans entrer dans les détails techniques, rappelons que la lecture est faite par un photomètre à deux cellules, à travers une paire de filtres interférentiels de 505 m μ , à bande passante étroite [10]. le choix de ceux-ci étant important. La figure suivante résume le montage : cellule de mesure et cellule de référence déterminent un courant qui, haché (CHOPPER) est amplifié et détermine un champ magnétique qui fait tourner plus ou moins un moteur ramenant le curseur de l'enregistreur à sa position d'équilibre.

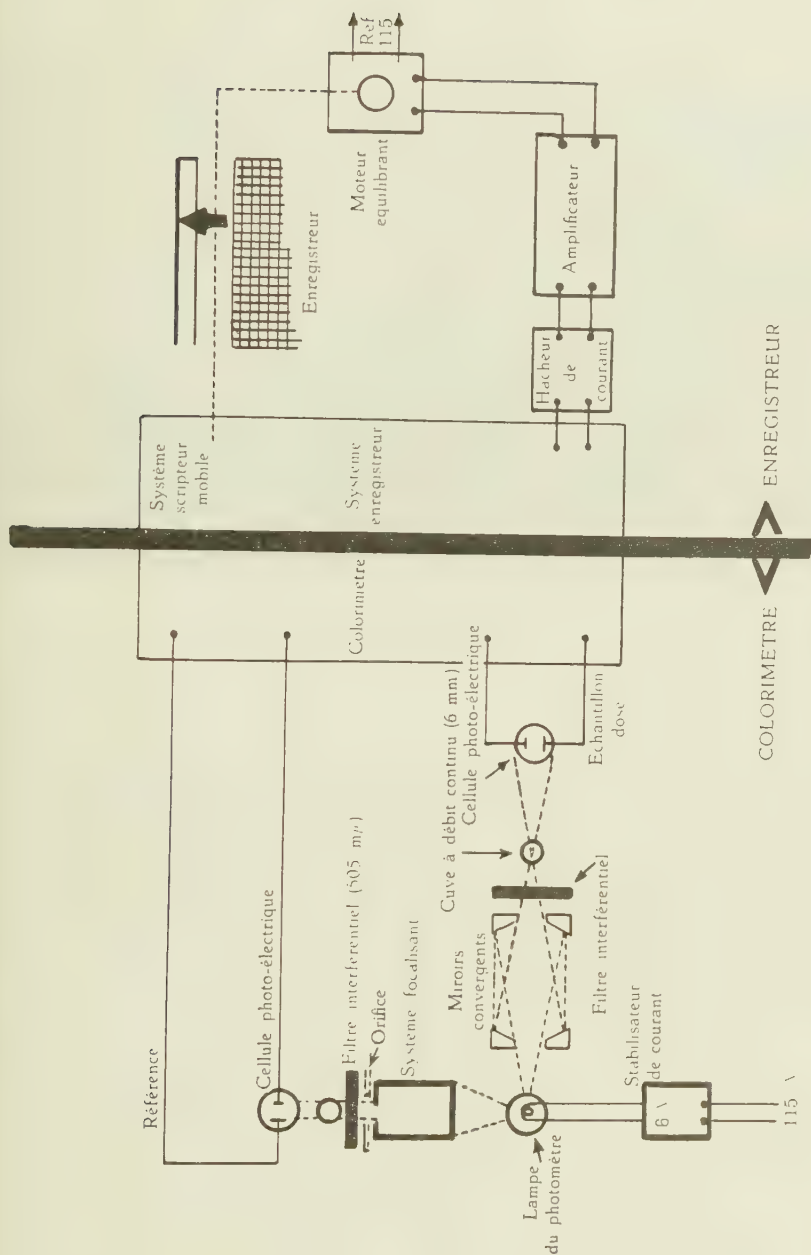


Figure 7

Le principe du photomètre enregistreur

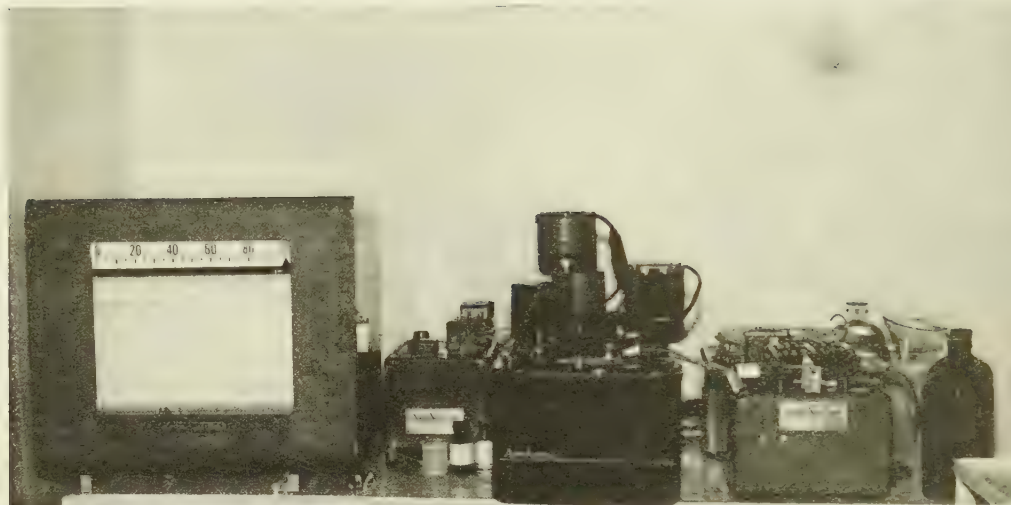


Figure 8

Enfin, voici ci-dessus l'auto-analyseur au complet. De droite à gauche : la pompe proportionnante, le dialyseur, le photocolorimètre et l'enregistreur. On voit, derrière la micropompe, le plateau distributeur automatique pour étalonnage ou dosages d'échantillons différents. Sur le sujet, on relie directement la pompe par un fin cathéter à une aiguille à ponction veineuse d'un type spécial.

Résultats

du dosage du calcium non protéique par dialyse

I. — ISOLEMENT D'UNE NOUVELLE FRACTION CALCIQUE

Il existe une fraction calcique obtenue par dialyse du sérum ou du plasma, à une dilution donnée, à la température du corps, en milieu isotonique, tamponné ou conservé au pH physiologique, en un temps donné et constant.

Lorsque le dosage de cette fraction est réalisé colorimétriquement en quarante-cinq secondes, par la murexide, vers pH 11,5 par la diéthylamine, avec lecture à 505 m μ , le chiffre moyen normal est de 58 mg/l *si l'on dilue un volume de sérum avec deux volumes de diluant*, comme dans la technique de SOULIER et CROSNIER.

— En utilisant un tampon glycolle-bicarbonate comme diluant du sérum dans les mêmes proportions, nous avons effectué 103 dosages, tous échelonnés de 54 mg/l à 63 mg/l. La moyenne de ce groupe était donc 58,5 mg/l. Parmi ceux-ci, 77 étaient compris entre 56 et 61 mg/l, ce qui représente la répartition $\pm \sigma$ (écart-type).

— Une meilleure stabilité et une plus grande précision ont pu être obtenues avec un tampon véronal-CIH (MICHAELLIS) fixé à 7,4-7,5. Sur une série de 110 dosages, la valeur moyenne obtenue est 58,6 mg/l. La répartition $\pm \sigma$ est ici de 74 dosages, entre 56 et 60 mg/l (toujours en diluant à 2/1).

— On peut considérer la normale de cette technique comme étant :

$$58 \pm 2 \text{ mg/l}$$

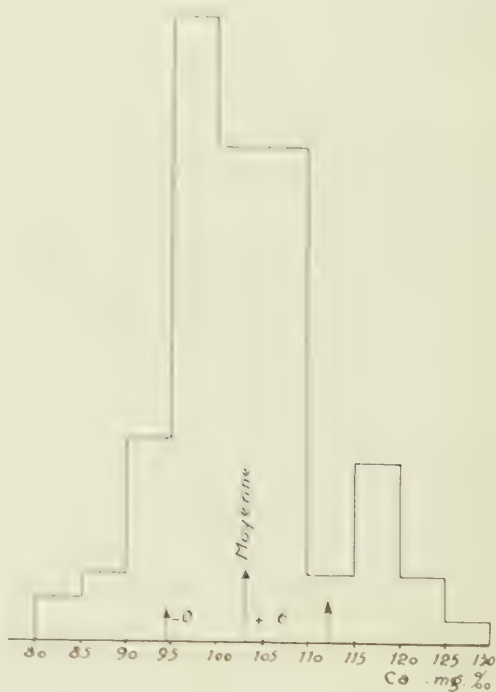


Figure 9

110 dosages de Ca^{++} sur
sérum (tampon véronal ClH
à pH 7,4)

Figure 10

Courbe de répartition des
résultats (calcium total) par
la méthode de GAUTHIER et
PIGNARD (101 dosages)



Sa répartition en deux groupes rappelle celle que GAUTIER et PIGNARD ont obtenue sur sang total [45].

Quelques résultats pathologiques :

Ainsi que nous l'avons dit dès le début de ce mémoire, nous n'avons encore entrepris aucune étude systématique portant sur un syndrome clinique, *désirant avant tout contrôler sur un grand nombre de cas les chiffres normaux : c'est sur un total de 300 cas environ que nous avons pu obtenir les répartitions figurées plus haut*, qui permettent de délimiter exactement le Ca^{++} dosé par dialyse dans les conditions précisées plus haut.

Cependant, les hasards de la Pharmacie de la Salpêtrière nous ont conduit à quelques dosages franchement anormaux qui constituent, espérons-le, des prémices :

- chez un sujet gastrectomisé et porteur d'une bacillose génito-urinaire : 50 mg/l ;
- chez un sujet nord-africain dénutri présentant des troubles hépato-biliaires : 47 mg/l ;
- chez une malade présentant une tétanie certaine : 39 mg/l. Cette malade, le même jour, avait un calcium total à 68 mg/l, ce qui donne un rapport de 57 %.

Même si la dilution ionise (et ceci est certain) une partie du calcium facilement ionisable, il semble que les variations pathologiques puissent être décelées. Mais, comme on le verra plus loin, *on peut serrer de plus près la vérité*.

II. — MODIFICATIONS RÉCENTES DE LA TECHNIQUE

Mais, et l'on touche ici à la difficulté technique du dosage, tout intervient dans ce dosage qui, nous l'avons dit, n'est théoriquement que celui du calcium ionisé, la murexide ne complexant le métal alcalin que sous cette forme.

Or, recherchant une meilleure stabilité et une plus grande précision, nous avons été amenés à deux modifications importantes de l'appareillage et des réactifs :

1° Nous avons *augmenté le temps de colorimétrie* jusqu'à le doubler (pour atteindre une minute et demie) par l'adjonction d'une bobine mélangeuse juste avant l'arrivée à la cuve du photomètre : ainsi régularise-t-on considérablement l'inévitable flux et reflux dû au pompage (discontinu) des réactifs et des échantillons.

2° Par ailleurs, comme on l'a vu, le remplacement de la diéthylamine par KOH a amené le pH final à 13 (au lieu de 11,5 à 11,7 comme précédemment). C'est alors que nous avons observé deux phénomènes remarquables et qui nous ont intrigué, puis passionné :

- d'une part, l'invariabilité de l'étalonnage — qui, au même pH, n'est pas changé par la modification du temps de colorimétrie ;
- d'autre part, les variations très nettes de la quantité « moyenne » de calcium dosé par la murexide, variations manifestement fonction du pH final, mais aussi du temps de colorimétrie.

L'explication que nous proposons à ces phénomènes est la suivante :

- dans le cas des solutions-étalons, à base de chlorure de calcium dilué dans du sérum salé (isotonique ou non), le métal se trouve sous forme quasi *totale*ment ionisée, donc dosé instantanément (peut-être en moins de trente secondes) par la murexide. Ici, la réaction colorimétrique est donc immédiate et le calcium présent dosé *en totalité* ;
- par contre, le calcium présent dans le dialysat se trouve manifestement sous deux formes : une forme ionisée (Ca^{++} du sang et Ca^{++} formé au cours de la dilution préalable et de la dialyse) et une forme *diffusible*, certes, *mais non ionisée*.

Dès que l'on allonge le temps de contact avec une base forte, il se forme $\text{Ca}(\text{OH})_2$, d'où Ca^{++} peut être complexé par la murexide. Si l'on allonge le temps de contact en élevant le pH — comme dans le montage que nous avons récemment mis au point — la murexide dose *tout* le calcium non protéique qui a dialysé, *qu'il ait été ionisé ou non dans le prélèvement initial*.

En résumé :

- avec un faible temps de colorimétrie (quarante-cinq secondes) et un pH de 11,5 (diéthylamine), le taux du calcium obtenu par dialyse du sérum va de 55 à 60 mg par litre ;
- si l'on allonge simplement le temps en maintenant le pH au même niveau, les chiffres apparaissent *légèrement supérieurs* (autour de 60 mg/litre) ;

— si l'on double temps (une minute et demie) et qu'on élève le pH à 13 (par KOH), les chiffres du calcium diffusible (ou plus exactement : dialysable) atteignent 65 à 66 mg/litre de sérum. Il est frappant de constater qu'on retrouve exactement ici le calcium « ultrafiltrable » de TORIBARA.

Pour de multiples raisons, la principale étant la nécessité d'utiliser une technique fidèle et reproductible, afin de juger exactement du calcium protéique, c'est ce dernier chiffre que l'on peut retenir comme l'expression de la totalité du calcium « dialysable » non protéique obtenu dans les conditions décrites, s'étalant entre 60 et 69 avec un maximum de fréquence entre 64 et 67.

L'idéal serait de « saisir » par un artifice technique le calcium ionisé seul, puis le calcium dialysable, selon la technique précédente, enfin doser le calcium total par une méthode classique. On ne doit pas perdre de vue l'intérêt (souligné plus haut) qu'il y a à élever le pH final de la colorimétrie, pour éliminer avec certitude toute interférence possible du magnésium. Comme on va le voir, c'est surtout sur la dilution du prélèvement qu'on peut agir.

Ces dernières semaines, nous avons pu encore améliorer ce problème en jouant sur la dilution : en diminuant de moitié la dilution du sérum (c'est-à-dire en diluant ce dernier à volume égal — et non plus avec deux volumes de tampon), les résultats s'échelonnent beaucoup plus bas.

Il semble donc qu'on isole une fraction plus proche de ce que l'on a appelé le calcium ionisé. Cette fraction va de 50 à 56 mg/l. La normale pourrait donc être définie comme 53 ± 3 . En réduisant la dilution, on ne trouve plus de taux supérieurs à 60, comme précédemment.

Tel est le problème posé par ce dosage, sur sérum ou plasma, relativement simple puisqu'on a l'impression d'en saisir les diverses variables. Les résultats obtenus sont assez satisfaisants pour l'esprit, puisqu'ils dissocient de façon évidente les deux fractions diffusibles affirmées par les physiologistes et les biochimistes depuis longtemps et qu'ils aboutissent à isoler une fraction dont les variations apparaissent sensibles avec les conditions physico-chimiques du milieu, tout comme le calcium ionisé de l'organisme.

En réduisant encore la dilution (prélèvement : 0,40 ml/mn et diluant = 0,32), nous avons dosé une cinquantaine de sérums (dilués avec tampon véronal à pH = 7,4) et obtenu une répartition étagée de 45 à 55, la valeur moyenne oscillant entre 50 et 52 mg/litre, donc sensiblement inférieure au chiffre précédent.

Enfin et surtout, grâce à un artifice technique, nous avons *tout dernièrement* réussi à dialyser des *plasmas purs non dilués, dialysés dans l'heure suivant leur prélèvement*. Voici les seize chiffres obtenus :

32	36	30	31
36	40	39	35
31	37	31	35
41	40	36	39

Il s'agissait de malades de la Clinique des maladies du système nerveux (Hôpital de la Salpêtrière), en principe sans trouble du métabolisme phospho-calcique.

Ces résultats laissent supposer que tel est *le chiffre réel du calcium ionisé dans le plasma, largement accru par la moindre dilution*. L'avenir est donc dans une amélioration de cette technique, certainement plus exacte que les précédentes, mais sûrement moins commode : la dialyse semble s'y faire irrégulièrement après un premier pic toujours bien détaché : ce premier pic est-il le calcium ionisé qui dialyse très rapidement avant toute dilution par le liquide de contre-dialyse ?

III. — DOSAGES DU CALCIUM NON PROTÉIQUE SUR SANG TOTAL

Connaissant ces données, on devine que les choses se compliquent lorsqu'on essaie de répéter le dosage sur sang total, condition d'épreuves en continu.

Elles ne se compliquent pas du fait d'un problème technique ; le sang total, recueilli sur héparine, dialyse parfaitement lorsqu'on le dilue convenablement à pH défini. Par ailleurs, la technique utilisant KOH et une murexide conservée à zéro degré, assure une stabilité très bonne, presque comparable à celle du dosage du glucose par le ferri-cyanure. Nous avons pu déjà enregistrer, durant une ou deux heures, une dizaine de malades de la Clinique des maladies mentales (Hôpital Sainte-Anne) dans le Laboratoire d'électroencéphalographie équipé, ainsi qu'on le dira plus loin, pour la polygraphie sous contrôle biochimique continu.

Mais ces premiers enregistrements furent pleins de surprises : la dilution du sang avec du sérum physiologique ordinaire, dans la proportion de deux volumes pour un de sang, fit apparaître des chiffres allant de 55 à 58 mg de calcium... ce qui, correction faite de l'hématocrite, *devrait correspondre sensiblement au calcium total du sang circulant*.

En effet, on peut calculer théoriquement le taux du calcium non-protéique sur sang total : s'il est (à la dilution de 2/1) de 65 à 66 mg/l dans le sérum, il devrait être de 39 mg/l en admettant une correction moyenne de 40 % représentant le volume occupé réellement par les globules rouges. Le calcium total, dosé sur un litre de sang, n'est en effet que de 50 à 70 mg — soit une moyenne de 60 mg par litre. On retrouve d'ailleurs ces chiffres par l'équation :

$$\frac{\text{Ca non protéique du sérum}}{\text{Ca total du sérum}} = \frac{\text{Ca non protéique du sang}}{\text{Ca total du sang}}$$

soit :

$$\frac{65}{100} = \frac{39}{60} = 0,65$$

Or, nous trouvions des chiffres allant de 55 à 60 mg par litre de sang.

Nous avons pensé que cet excès était dû à la dilution par un liquide fortement acide (le sérum physiologique est à pH 5). Nous avons donc repris le tampon véronal (pH = 7,4) et obtenu alors des chiffres allant de 48 à 50 mg. Mais, plus que ce problème de pH, l'explication tient peut-être dans les faits suivants : avec le montage employé, nous amenions deux volume d'un diluant (dépourvu de calcium, naturellement) pour un volume de sérum.

Mais, dans le cas du sang total prélevé *in vivo*, le plasma se trouvait dilué *non plus dans la proportion de 2 pour 1, mais dans celle de 4 pour 1* (ou à peu près), étant donné le volume occupé par les éléments figurés du sang. A ce moment, une profonde modification de l'équilibre Ca^{++}/Ca protéique intervient vraisemblablement, aboutissant à la libération de la quasi-totalité du calcium lié aux protéines.

* *

Pour tenter de démontrer ce fait, nous avons réduit le volume du diluant, le rendant égal à celui du sang prélevé (par unité de temps), et nous avons alors obtenu les chiffres suivants sur 10 sangs totaux recueillis sur héparine (le diluant étant naturellement le tampon véronal) :

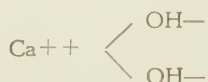
40	45
44	44
39,5	49
44	43
45	40

Or, les mêmes sangs, dosés le même jour, avec le même montage, mais dilués avec du sérum physiologique, ont donné des chiffres cette fois tous supérieurs à 45 et atteignant 55 : le pH joue donc un grand rôle pour les dilutions ≥ 1 , mais son rôle paraît moins important que celui de la dilution.

On est sans doute loin de corriger ce résultat encore excessif : ayant démontré l'extrême labilité d'une partie du calcium protéique, comment dialyser un sang total sans le diluer ? Ce fait ne pourrait être résolu que par un système automatique séparant le plasma avant dosage du Ca^{++} et adaptable au continu.

IV. — CRITIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS

En principe, la murexide ne dose que le calcium libre, sous forme ionisée (Ca^{++}). En fait, ainsi qu'on l'a démontré plus haut, le pH alcalin et un certain temps de contact doivent permettre la formation de :



à partir du calcium qui a dialysé, non ionisé.

On a vu comment réduire ce phénomène en abaissant le pH (mais alors le magnésium interfère) et en diminuant le temps de contact (mais au détriment de la stabilité). Il reste à améliorer les artifices, permettant le dosage du Ca^{++} vrai du sérum — qui est sans doute autour de 35 à 40 mg/litre, si l'on fait une moyenne des chiffres rapportés plus haut.

Le dosage du *calcium dialysable* — ou, plus exactement, du calcium non-protéique (non-protein bound calcium — ou NpbCa dans la littérature anglo-saxonne) — est lui très aisé et praticable dès maintenant sur une grande échelle et se pliant aux conditions rigoureuses définies. *Le meilleur montage semble être actuellement :*

— Prélèvement (plasma)	0,80 ml/mn
— Segmentation (air)	2 ml/mn
— Diluant (sérum physiologique)	0,32 ml/mn
— Contre dialyse (sérum physiologique)	1,6 ml/mn
— Murexide (100 mg/l)	1,2 ml/mn
— KOH (10 g/l)	1,2 ml/mn

Le dosage étant fait sur plasma conservé à l'abri de l'air et dans les heures suivant le prélèvement.

Le dosage de cette fraction sur sang total se heurte encore à d'importants problèmes pratiques, mais le fait d'avoir maintenant à sa disposition une colorimétrie stable, est très encourageant. On peut déjà, en tout cas, très facilement, suivre le calcium total et continu chez un sujet, au prix d'un prélèvement sanguin de 0,42 ml/mn — soit environ 26 ml en une heure — ce qui est très acceptable.

Un fait nous paraît intéressant : si nous essayons de doser un plasma recueilli sur fluorure ou citrate (par exemple, un prélèvement pour glycémie), nous ne trouvons qu'une quantité insignifiante de calcium — même à pH 13 et temps de réaction prolongé. Ce fait confirmerait le taux très faible du citrate de calcium du sang *in vivo*, le calcium ultrafiltrable non ionisé (mais ionisable par KOH) se trouvant sous d'autres formes plus facilement dissociables : carbonate, complexe phospho-calcique, combinaison avec certains acides aminés, acétate, etc.

* *

Que représente ce calcium non protéique ? Logiquement, celui qui peut pénétrer les espaces interstitiels et être complexé par la membrane ou même pénétrer dans la cellule.

S'il en est ainsi, diverses épreuves fonctionnelles, basées sur le dosage de cette fraction, pourront peut-être se révéler pleines d'intérêt, ne serait-ce que pour étudier le mode de réactivité — au cours d'une surcharge ou d'une spoliation calcique — dans les divers états évoqués précédemment, mais aussi en physiologie humaine, pour des tests pharmacodynamiques et le contrôle de certaines thérapeutiques. A défaut d'un contrôle continu, de prises de sang répétées et minutées pourraient être envisagées avec dosage sur plasma immédiatement séparé par centrifugation.

La polygraphie sous contrôle biochimique

Avant de terminer, nous voudrions situer cette recherche dans un ensemble : la mise au point d'épreuves fonctionnelles permettant d'explorer les divers métabolismes dont le système nerveux apparaît tributaire.

Durant les six derniers mois, nous avons, avec le Docteur L.J. ENDTZ (de l'Université de Leyde), dans le service de notre Maître le Professeur R. GARCIN, étudié deux épreuves fonctionnelles simples apportant des précisions de valeur sur les carences en thiamine ou en pyridoxine. L'épreuve d'hyperpyruvicémie provoquée et celle de charge en tryptophane sont parmi les premières apportant des données objectives sur un trouble métabolique.

Depuis 1958 nous pratiquons régulièrement au laboratoire d'E.E.G. du Docteur VERDEAUX (Clinique du Professeur Jean DELAY) le contrôle de la glycémie en même temps que la polygraphie, selon la technique décrite par G. et J. VERDEAUX il y a cinq ans [154 bis]. Rappelons en quelques mots le principe de cette investigation, qui rassemble le maximum de données compatibles avec le respect du malade.

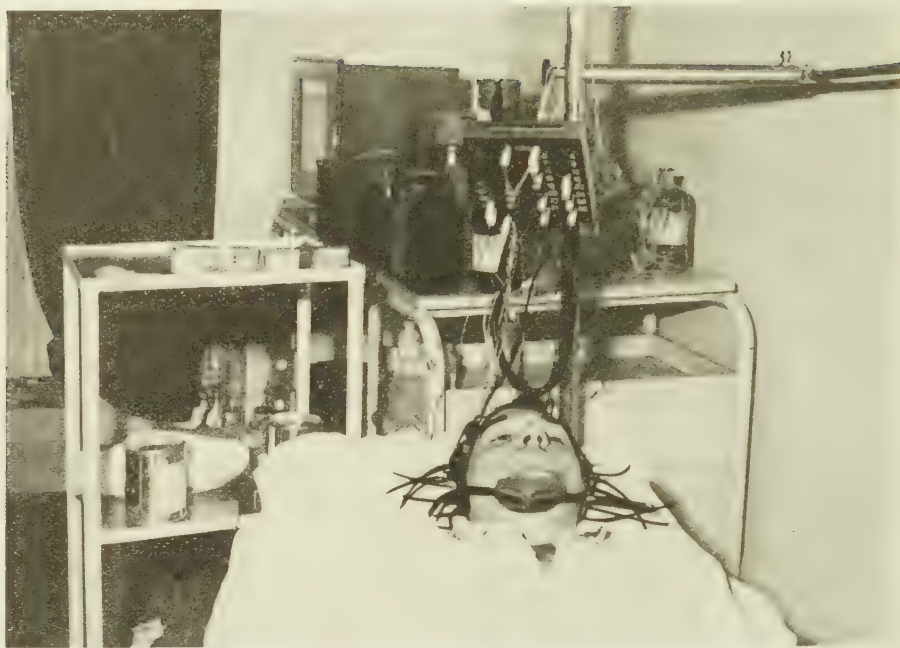


Figure 11

Le malade est confortablement allongé sur un lit de repos, la nuque bien calée, en relaxation totale. Les électrodes sont posées simplement, si l'enregistrement doit durer peu de temps, ou collées (pour éviter la sensation pénible du casque) si on envisage un contrôle prolongé (plus d'une demi-heure). La figure ci-dessus montre l'installation du malade ; derrière lui se trouve l'auto-analyseur et à sa droite l'appareil d'E.E.G. (dix plumes).



Figure 12

Sur cette autre figure, on distingue les électrodes pour l'électrocardiogramme, le réflexe psycho-galvanique (R.P.G. ou électrodermogramme) et l'aiguille de ponction veineuse en place dans la veine du sujet, le bras étant immobilisé par une planchette garnie de coton qui permet au malade la relaxation indispensable aux enregistrements.

Le pneumogramme est donné par un couple thermo-électrique.

Au total, on contrôle simultanément :

- l'activité électrique de chaque hémisphère ;
- l'activité cardiaque ;
- le rythme respiratoire ;
- le réflexe psycho-galvanique, réputé, traduire assez fidèlement l'état émotionnel du sujet ;
- enfin une constante biochimique du sang circulant.

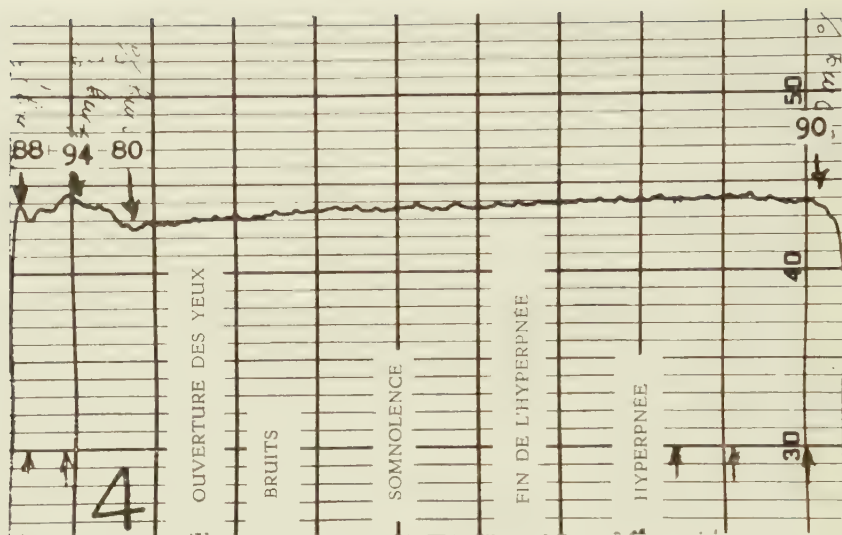


Figure 13

La synchronisation des enregistrements peut être aisément réalisée au moyen de repères graphiques inscrits simultanément sur le tracé fourni par l'appareil d'E.E.G. — et celui de l'auto-analyseur où chaque division (cf. fig. 16, p. 85) représente une durée de trois minutes.

La polygraphie sous contrôle biochimique a déjà révélé d'intéressants aspects de l'électroencéphalographie « fonctionnelle » qui vise l'étude du comportement et des réactions psycho-physiologiques. Voici, ci-dessus, un tracé portant sur le glucose sanguin, enregistré durant les épreuves classiques d'un électroencéphalogramme standard : hyperpnée, stimulations auditives, ouverture et fermeture des yeux.

On constate une baisse régulière de la glycémie dans les minutes qui suivent l'hyperpnée. Fait remarquable, une somnolence survient, les stimuli auditifs n'entraînant aucune réaction, mais l'ouverture des yeux semble « éveiller » le sujet, ce qui concorde avec un retour de la glycémie au chiffre de départ, avec quelques oscillations.

Appliquée aux épreuves fonctionnelles classiques, l'analyse en continu des constantes du sang apportera certainement des précisions extrêmement intéressantes, non décelables au moyens des 4 ou 5 prises de sang, plus ou moins minutées, liées aux incidents locaux des ponctions veineuses répétées.

La seule nécessité est d'injecter une petite dose d'héparine pour permettre un prélèvement continu sans coagulation : 50 mg d'héparine suffisent en règle pour une heure — et 75 à 100 mg pour un temps de deux à trois heures.

Voici, à titre d'exemple (*fig. 14*), le profil d'une hyperglycémie (par voie veineuse) et celui d'une hypoglycémie (*fig. 15*) chez un sujet qui manifesta une sensibilité extrême à l'insuline puisqu'une seule unité lui fut injectée : nous avons eu d'ailleurs l'impression générale d'une grande sensibilité (avec chutes importantes mais souvent passagères) à l'insuline injectée par voie veineuse, plus marquée qu'il n'est classique de le dire.

Signalons que ces courbes se lisent de droite à gauche.

Une dernière figure (*fig. 16*) montre, mieux que tous les textes, le grand intérêt de la polygraphie sous contrôle biochimique : au cours d'une hypoglycémie provoquée, on voit apparaître (pour une petite dose d'insuline) tous les signes de l'encéphalopathie hypoglycémique : la chute du glucose circulant — qui passera de 0,74 à moins de 0,20, s'accompagne d'ondes lentes survenant par bouffées paroxystiques tandis que le rythme de base se ralentit. Parallèlement, le sujet présente une hyperhydrose importante, une subexcitation et un léger état confusionnel — une tachycardie, une polypnée, et une augmentation nette du réflexe psycho-galvanique signent la réaction d'alarme, c'est-à-dire, très vraisemblablement, la décharge d'adrénaline qui va faire remonter aussitôt le taux du glucose sanguin.

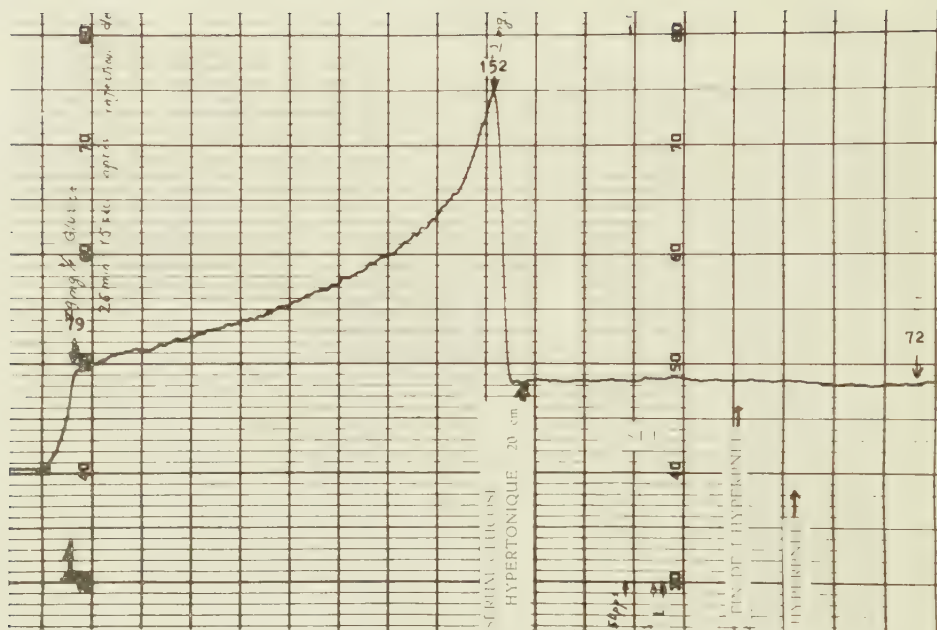


Figure 14 — Epreuve d'hyperglycémie provoquée

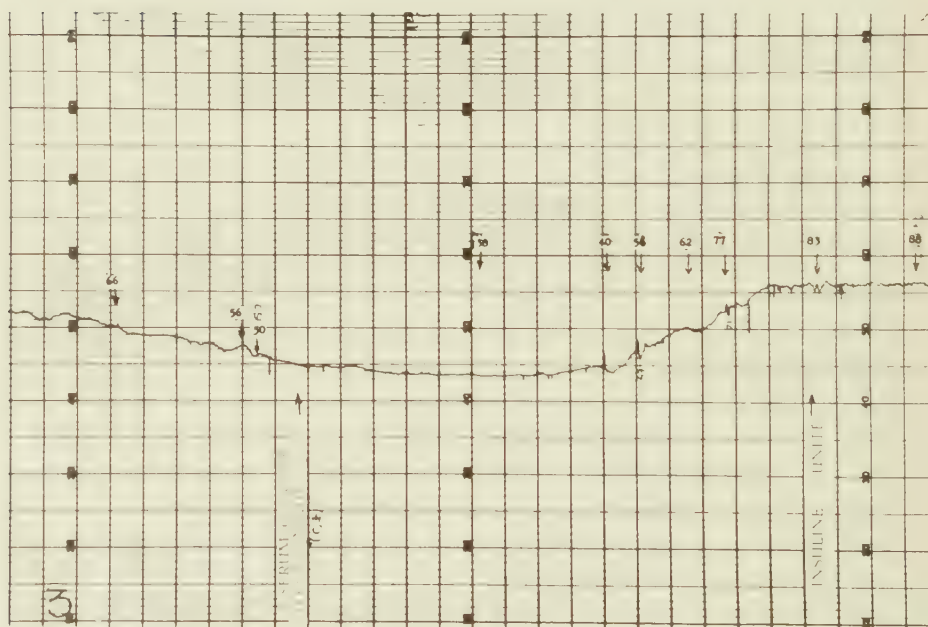


Figure 15 — Epreuve d'hypoglycémie provoquée

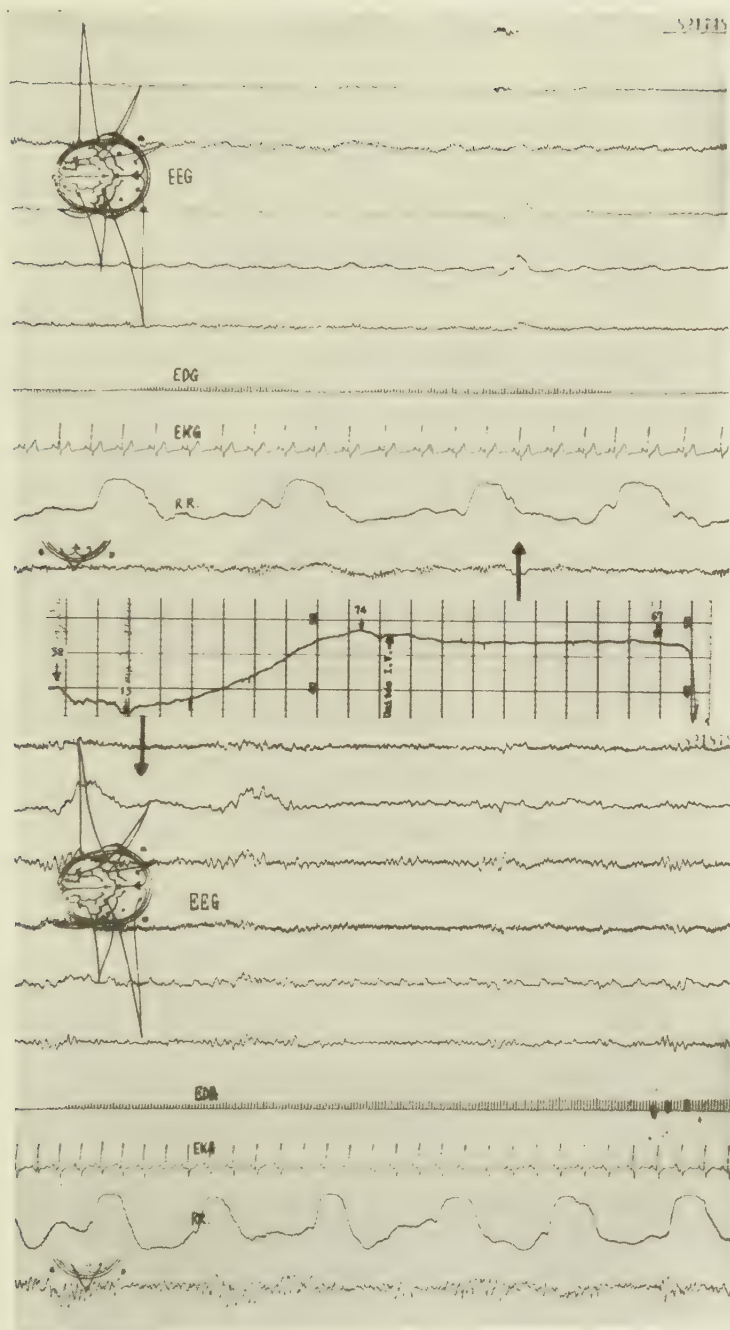


Figure 16

Exemple d'une polygraphie sous contrôle biochimique
(hypoglycémie provoquée)

AU TOTAL, on comprendra les raisons qui nous ont poussé à élargir les possibilités de cette méthodes, certes vers le calcium total, mais surtout vers les fractions non protéiques diffusibles qui subissent vraisemblablement d'importantes modifications physiologiques, pathologiques, ou au cours de certaines thérapeutiques. Bien d'autres constituants du plasma peuvent être obtenus par dialyse, et chaque jour élargit les possibilités de l'analyse automatique en continu.

Les enregistrements en continu devraient permettre de préciser le *mode de réaction qui est probablement plus important que les chiffres eux-mêmes*. Certains sujets sont-ils incapables de mobiliser le calcium protéique pour le rendre diffusible ? D'autres ont-ils une répartition anormale des différentes fractions calciques, le total restant normal ?

* *

Toutes ces épreuves dynamiques convergent vers un seul but : *saisir, au plus près possible, la vie, dans ses diverses manifestations.*

CONCLUSIONS

I. — Le dosage du calcium total est apparu relativement décevant : il représente en effet une somme, celle du calcium ionisé (Ca^{++}) et du calcium protéique, ce dernier constituant la première réserve, en liaison avec le Ca^{++} par l'intermédiaire d'une fraction diffusible mais non ionisée.

II. — Or le rôle biologique du Ca^{++} est considérable : c'est le calcium immédiatement utilisable par la cellule, directement complexable par la membrane cellulaire.

III. — Malgré le grand nombre de travaux entrepris pour doser cette fraction, très peu jusqu'ici l'ont été dans des conditions rappelant celles du milieu cellulaire : or, l'appréciation du Ca^{++} est étroitement liée à des conditions de température, d'isotonie, et de pH.

IV. — Nous avons mis au point une technique originale de dialyse basée sur ces conditions. Relativement simple, elle permet d'effectuer un grand nombre de dosages successifs, ouvrant ainsi de larges possibilités de recherches.

V. — Le chiffre normal du calcium non protéique obtenu par dialyse du sérum sanguin dans des conditions précises est :

$$58 \text{ mg} \pm 2/\text{l.}$$

La répartition de cette fraction, chez les sujets normaux, se fait entre 54 et 65 mg/l. Elle est semblable à celle du calcium total dosé par la même réaction colorimétrique. Une autre technique donne des chiffres normaux légèrement supérieurs, étalés entre 60 et 68 mg/l : on dose alors la totalité du calcium non protéique. Inversement la réduction de la dilution du prélèvement apporte des résultats légèrement inférieurs, étalés entre 50 et 60 mg/l. La dialyse de plasmas non dilués isole une fraction beaucoup plus faible : 35 à 40 mg/l.

VI. — On peut, selon certaines conditions techniques, doser cette même fraction sur le sang total prélevé directement dans la veine : grâce à un dispositif de microdosages effectués en continu, il est possible de suivre ses variations dans le sang circulant, durant une ou deux heures si nécessaire. Ces chiffres normaux s'étalent de 40 à 45 mg/l de sang total.

VII. — L'intérêt de ce dosage et de ses applications en physiologie et en pathologie humaines, notamment en ce qui concerne les maladies du système nerveux, sont envisagés.

Des épreuves d'hyper ou d'hypocalcémies provoquées peuvent être suivies, sur la fraction calcique libre, en continu, selon la technique utilisée antérieurement pour l'étude du glucose sanguin, technique d'exploration métabolique qui permet de saisir les variations les plus brèves comme les plus minimes.

VIII. — Il est enfin possible d'apprécier, par le même procédé, les fractions dialysables d'autres constituants du plasma.

Vu, le Doyen :
BINET

Vu, le Président de Thèse :
DELAY

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris :
SARRAILH

BIBLIOGRAPHIE

1. ALAJOUANINE (Th.), CONTAMIN (F.) et CATHALA (H.P.). — Le syndrome tétanie. (Paris, J.-B. Baillière éd., 1958.)
2. ANNING (S.T.), DAWSON (J.), DOLBY (D.E.) et INGRAM (J.T.). — The toxic effects of calciferol. (*Quart. J. Med.*, 1948, n.s. 17, 203.)
3. BENDIEN et SNAPPER. — Untersuchungen über die Bindung der Kolloide des serums mit Hilfe von Ultrafiltern erhöhter Durchlässigkeit (in *Biochem. Zeitschrift*, 1933, 260, 105.)
4. BENEZECH (C.). — Physico-chimie biologique et médicale. (Masson éd., 1958.)
5. BENJAMIN (H.R.) et HESS (A.C.). — The forme of the calcium and inorganic phosphorus in human and animal sera: normal, rachitic, hypercalcemic and other conditions. (In *Journal Biol. Chemistry*, 1933, 100-27.)
6. BLUM (C.) et DELAVILLE (M.). — L'étude des modifications du sang et des humeurs par l'ultrafiltration. (In *C.R. Ac. Science*, 9 mars 1925, 17, pp. 764-765.)
7. BRAUCHLI (E.) et SCHNIDER (O.). — Über die Ionenverschiebungen im Blut bei Narkose und Erregungszustanden. (*Arch. für Exp. Path. u. Pharmak.*, 1926-1927, 119, 240-253.)
8. BRINK (F.). — The role of calcium in neural processus. (In *Pharmacological Reviews*, 1954, 6, 243-298.)
9. BRINKMAN (R.). — Einige Bemerkungen über die Bedeutung des Blutkalks. (In *Biochem. Zeit.*, 1919, XCV, 101.)
10. BROWN (E.B.), CAMPBELL (G.S.), ELAM (J.O.), GOLLAN (F.), HEMINGWAY (A.) et VISSCHER (M.). — Electrolyte changes with chronic passive hyper-ventilation in man. (In *Journ. Appl. Physiol.*, 1949, I, 848.)
11. BROWN (E.B.). — Physiological effects of hyperventilation. (In *Physiological Rev.*, 1953, 33 (4), 445.)
12. BROWN (E.B.). — Role of hyperkalemia in production of ventricular fibrillation following hypercapnia. (In *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1955, 90-319.)

13. BROWN (E.B.) et PRASAD (A.). — Plasma ultrafiltrable calcium concentration in post-hypercapnia ventricular fibrillation. (In *Am. Journ. Physiol.*, 1957, 190-462.)
14. BRULL (L.). — Physiologie et pathologie générales du calcium. (*Congrès Français de Médecine*, XXI^e session, Liège, Masson éd., 1930.)
15. CAMERON (A.T.) et MOORHOUSE (V.H.K.). — The tetany of parathyroid deficiency and the calcium of the blood and cerebro-spinal fluid. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1925, 63, 687.)
16. CANARY (J.J.) et KYLE (L.H.). — The hypercalciuria of hyperparathyroidism in man. (*Proc. of the 51 Annual Meeting of the Am. Soc. for Clin. Invest.*; — *J. Clin. Invest.*, juin 1959, 38, 6, 994.)
17. CANTAROW (A.). — Mineral metabolism: ch. 4 in. Diseases of metabolism (detailed methods of diagnosis and treatment), 4^e édit. par G. Duncan-Saunders, 1959.
18. CARR (C.W.). — Studies on the binding of small ions in proteins solutions with the use of membrane electrodes: the binding of calcium ions in solution of bovins serumalbumine. (In *Archives of Biochemistry*, 1953, 43, 147.)
19. CHEYMOL (J.). — Expériences sur la calcémie du chien. (*Thèse Médecine*, Paris, 1932.)
20. CHILCOTE (M.E.) et WASSON (R.D.). — A new micromethod for the colorimetric determination of calcium in serum or urine. (In *Clinical Chemistry*, juin 1958, 4 (3), 200.)
21. CLARK (E.P.) et COLLIP (J.B.). — A study of the Tsidall method for the determination of blood calcium with a suggested modification. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1925, 63, 461.)
22. CLARKE (H.T.) et NACHMANSOHN (D.). — Ion transport across membrane. (Academic Press, 1954.)
- 22 bis. COIRAULT (R.), DESCLOS DE LA FONCHAIS (S.), RAMEL (P.) et NEIGER (E.). — Les variations du calcium sanguin total, du calcium sanguin ionisé et du calcium urinaire/vingt-quatre heures au cours de la sismothérapie et des traitements chimiothérapiques à action anxiolytique (Imipramine et Nialamide). (In *Medicina Exp.*, 1959, I (3), 178-186.)
23. COPP (H.). — Calcium and phosphorus metabolism. (In *Amer. Journ. of Med.*, février 1957, 275.)
24. CORRADO (A.P.), RAMOS (A.O.) et ESCOBAR (C.T. DE). — Neuro-muscular blockade by neomycin, potentiation by ether anesthesia and d-tubocurarine, and antagonism by calcium and prostigmine. (*Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1959, CXXI, 3-4, 380.)
25. CUSHNY (A.R.). — The colloïd-free filtrate of serum. (In *Journ. Physiol.*, 1919-1920, LIII, 391.)

26. DECOURT (J.), GUILLAUMIN (C.O.) et BERTHAUX (P.). — La tétanie avec alcalose et augmentation du potassium sérique, sans hypocalcémie. (In *C.R. Soc. Biologie*, 1950, 144-330.)
27. DELAY (J.), BOITELLE (G.) et LEULIER (R.). — A propos des troubles mentaux d'origine parathyroïdienne. (In *Ann. Méd. Psychol.*, 1948, 3, 334.)
28. DIGGINS (F.W.). — The stabilisation of ammonium purpurate for colorimetric use. (In *Analyst.*, 1955, 80, 401.)
29. DILLMAN (C.M.) et VISSCHER (M.B.). — The calcium content of ultrafiltrates of plasma and the influence of changes in H and bicarbonate ion concentration upon it. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1933, 103-791.)
30. DRINKER, GREEN et HASTINGS. — Equilibria between calcium and purified globulines. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1939, 131-641.)
31. DRINKER et ZINSSER. — The equilibrium between calcium and cephalin in various system. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1943, 148-187.)
32. DUVAL (Cl.). — Traité de microanalyse minérale. Tome I, p. 360. (Paris, 1954.)
33. DUVAL (Cl.). — Colorimétrie minérale. (Paris, Sedes, 1954.)
34. ECCLES (J.C.). — The physiology of nerve cells. (The John Hopkins Press, 1957.)
35. EHRSTROM (N.Ch.). — Psychische Beeinflussung des Blutserum Kalkspiegels. (*Acta Med. Scand.*, 1931, 74, 378-395.)
36. ELLIOTT (J.E.) et PEARSON (P.B.). — A direct photoelectric method for the determination of serum calcium. (In *Journal Lab. Clin. Med.*, 1946, 31, 1262.)
37. ELLIOTT (K.A.C.), PAGE (I.H.) et QUASTEL (J.H.). — Neurochemistry (the chemical dynamics of brain and nerve). (Ch.C. Thomas éd., 1955.)
38. FAZIO (C.) et SACCHI (U.). — Experimental catalepsy produced by substances introduced into subarachnoid spaces and ventricles. (In *Psychotropic Drugs*, p. 104, Elsevier éd., 1957.)
39. FELDBERG (W.). — The action of drugs injected into cerebral ventricles (a contribution to the study of subcortical convulsions and impairment of consciousness). (In *Psychotropic Drugs*, p. 303, Elsevier éd., 1957.)
40. FLINK (E.D.), MC COLLISTER (R.), PRASAD (A.S.), MELBY (J.C.) et DOE (R.P.). — Evidences for clinical magnesium deficiency. (In *Ann. Intern. Med.*, 1957, 47, 956.)
41. FOLCH (J.), LEES (M.) et SLOANE-STANLEY (G.H.). — The role of acidic lipides in the electrolyte balance of the nervous system of mammals. (In *Metabolism of the Nervous System*, p. 174, Richter-Pergamon éd., 1957.)

42. FRATER (R.), SIMON (S.E.) et SHAW (F.M.). — Muscle : a three phase system. The partition of divalent ions across the membrane. (*The J. of Gen. Physiol.*, septembre 1959, 43 (1), 81-96.)
43. FROST, JONES (R.E.) et YARDLEY (J.T.). — The colour reactions of chloranilic acid with particular reference to the situation of calcium and zirconium. (*In Analyst.*, 1952, 77, 468.)
44. FURMAN (R.A.), HELLERSTEIN (H.K.) et STARTZMANN (V.V.). — Electrocardiographic changes occurring during the course of replacement transfusions. (*J. Pediat.*, 1951, 38, 45, 9.)
45. GAUTIER (J.A.) et PIGNARD (P.). — Nouvelles méthodes pour le dosage du calcium dans le sérum et les liquides de l'organisme. (*In Ann. Pharmac. Franç.*, 1953, 11, 1.)
46. GILBERT-DREYFUS, MAMOU et ZARA. — Tétanie et système nerveux central. (*In Sem. des Hôp. de Paris*, 1950, 1429.)
47. GILLIGAN (D.R.), VOLK (M.C.) et ALTSCHULE (M.D.). — The diffusibility of plasma calcium following parathormone administration. Comparison of the calcium, phosphate, and proteins concentrations of serum and edema fluid. (*In Journ. Biol. Chemistry*, 1933, 103, 745.)
48. GLASER (F.). — Die Bedeutung des Serum - Kalkschwankungen bei hypnosen, funktionellen Neurosen und im Fieber. (*Münch. Med. Woch.*, 1925, 72, 373-374.)
49. GOLDBERG (H.H.). — The electroencephalogram in hypocalcemic syndromes. Eastern Assoc. of E.E.G. (N.Y.). (*In E.E.G. and Clin. Neurophysiol.*, vol. XI (2), 398-399.)
50. GRABAR (P.). — Sur la possibilité de séparer des colloïdes par passage à travers les membranes de porosité déterminée (ultrafiltration fractionnée). (*In C.R. Soc. Biol.*, 1934, 116-167.)
51. GREENBERG (D.M.) et GUNTHER (C.). — On the determination of diffusible and non-diffusible serum calcium. (*J. Biol. Chem.*, 1930, 85, 491.)
52. GREENBERG (D.M.) et LARSON (C.E.). — Evidence of absorption experiments on the forms of calcium and inorganic phosphorus in blood serum. (*In Journ. Biol. Chemistry*, 1935, 109 (1), 105.)
53. GREENE et POWER. — The distribution of electrolytes between serum and the *in vivo* dialysate. (*Journ. Biol. Chemistry*, 1931, 91, 183.)
54. GROLLMAN (A.). — Ultrafiltration through collodion membranes. (*In Journ. Gen. Physiol.*, 1926, 9, 813.)
55. GUILLAUMIN (C.O.). — Le métabolisme du calcium. Physiologie, techniques de mesures. Leur application au diagnostic. (*In Exposés Annuels de Biochimie Méd.*, série I, p. 232.)

56. GUNTHER (L.) et GREENBERG (D.M.). — The diffusible calcium of the blood stream in tetany. (*Arch. Int. Med.*, 1931, 47, 660.)
57. GUTMAN et GUTMAN. — Relation of serum calcium to serum albumine and globulin. (In *Journ. Clin. Invest.*, 1957, 16, 903.)
58. HARPER (H.A.). — Physiological chemistry. 7^e édit. (Lange Medical Publications, 1959.)
59. HARPER (T.A.). — A rapid micro-quantitative method for estimating serum calcium. (In *Nature*, janvier 1959, 183-232.)
60. HAZARD (R.). — Anions et cations. (In *Pharmacodynamie Biochimique*, p. 365. Masson éd., 1954.)
61. HERBERT (F.K.). — The total and diffusible calcium of serum and the calcium of C.S.F. in human cases of hypocalcoemia and hypercalcemia. (*Biochem. Journ.*, 1933, 27, 1978.)
62. HERTZ (W.). — Der ultrafiltrierbare Anteil des Serums Kalkes. (*Zeitsch. für Kinderheil.*, 1929, 47, 215.)
63. HINSBERG-LANG. — Medizinische Chemie, pp. 84-89. (Puffer, 1951.)
64. HODGKIN (A.L.) et KEYNES (A.L.). — Movements of labelled calcium in squid giant axones. (In *J. Physiol.*, London, 1957, 138, 253-281.)
65. HOPKINS (T.), HOWARD (J.E.) et EISENBERG (H.). — Ultrafiltration studies on calcium and phosphorus in human serum. (In *Bull. J. Hopkins Hosp.*, 1952, 91, 1-21.)
66. HOPKINS, CONNORD et HOWARD. — Ultrafiltration studies on calcium and phosphorus in human serum. (In *Bull. J. Hopkins Hosp.*, 1953, 93, 249.)
67. HOUSSAY (B.A.). — Physiologie humaine. (Ed. Méd., Flammarion, 1950.)
68. HUGHES (T.R.) et KLOTZ (I.M.). — Analysis of metal-protein complexes. (In *Methods of Biochemical Analysis*, vol. III, p. 265. Ad.D. Glick, Interscience, 1956.)
69. JOHNSON (Ph.C.), SMITH (W.O.) et WULFF (B.). — Calcium 45, binding by human pre-albumin. (*J. Appl. Physiol.*, 1959, 14 (5), 859-860.)
70. JUSTIN-BESANÇON (L.), KLOTZ (H.P.) et PLUVINAGE. — Les formes comitiales de la tétanie. (In *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1947, 63, 850.)
71. KABAKOW (B.). — Effets de l'hypocalcémie provoquée sur l'excitabilité et la conductivité myocardique. Utilisation de l'E.D.T.A. Etude de la déplétion en potassium. Intoxication digitalique et modifications digitaliques de l'électrocardiogramme. (In *A.M.A. Arch. Int. Med.*, juin 1958, 101 (6), 1029.)
72. KARANOVICH. — Colorimétrie du calcium avec la murexide. (In *Analyt. Abstracts*, 1957, 4, 3577.)

73. KATZ (S.) et KLOTZ (I.M.). — Interactions of calcium with serum albumin. (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, 44, 351.)
- 73 bis. KATZ (L.N.) et LINDNER (E.). — Action of excess Na, Ca, and K on coronary vessels. (*Am. J. Physiol.*, 1938, 124, 155-160.)
74. KINGSLEY (G.R.) et ROBNETT (O.). — New dye method for direct photometric determination of calcium. (In *Am. Journ. Clin. Path.*, février 1957, 27 (2), 223.)
75. KIRK (P.L.) et KING (C.G.). — Calcium distribution in blood. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1928, 11, 1926.)
76. KLOTZ (H.P.), BOUVRY (M.), ISRAEL (L.), LUMBROSO (P.) et RAVERDY (P.). — La tétanie chronique ou spasmophilie, signes, étiologie, pathogénie et traitement. (In *Pathologie et Biologie*, décembre 1956, 32 (XX/6), 695.)
77. KOVACS (G.S.) et TARNOKY (K.E.). — Le plasmocorinth B indicateur de titration complexométrique. (In *Analytica Chemica Acta*, 1959, 21, 3, 295.)
78. KOVACS (G.S.) et TARNOKY (K.E.). — Komplexometrische Bestimmung des Kalzium und Magnesiumgehaltes von urin. (In *Z. Fr. die Gesamt. In. Mediz. und Grenzgeb.*, 14, 18, 887.)
79. KRAMER (B.) et TSIDALL (F.). — A simple technique for the determination of calcium and magnesium in small amounts of serum. (In *Journ. Biol. Chemistry*, vol. XLVII (3), 475.)
80. KRETSCHMER (M.) et KRUGER (R.). — Über die Beeinflussung des Serum Kalkgehaltes in der Hypnose. (*Klin. Woch.*, 1927, 6, 695-697.)
81. LA BARRE (J.). — Digitale et calcium. (*Pharmacodynamie Biochimique*, p. 677. Masson éd., 1954.)
82. LABORIT (M. et G.). — Excitabilité neuro-musculaire et équilibre ionique. (Masson, 1955.)
83. LANNE (R. DE), BARNES (J.R.) et BROUHA (L.). — Changes in osmotic pressure and ionic concentrations of plasma during muscular work and recovery. (*J. Appl. Physiol.*, 1959, 14, 5, 804-808.)
84. LARCAN (A.) et HURIET (C.). — L'électrocardiogramme dysmétabolique (perturbations ioniques et E.C.G.). (Masson éd., 1959.)
85. LÉVY (J.) et PACU (M.M.). — Ultrafiltration du sérum et du plasma : teneur des ultrafiltrats de sérum et de plasma en Cl, K, Na, Ca, Mg. (In *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, XV (9), 1317.)
86. LÉVY (J.) et GALLAIS (F.). — Protéides et cations du sérum sanguin. (In *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, XV (9), 1330.)
87. LICHTWITZ (A.) et CLÉMENT (D.). — Le métabolisme du calcium. Régulations humorales et tissulaires du métabolisme calcique. (In *Sem. Hôp. Paris*, 30 (46-47 et 48-49), pp. 2866 et 2911.)

88. LLOYD (H.M.) et ROSE (G.). — Ionized calcium and parathyroid hormone. (*The Lancet*, 1958, II, 1258.)
89. LOKEN (H.F.) et GORDAN (G.S.). — Renal mechanisms in the production of hypercalcemia in hyperparathyroidism and breast cancer. (*J. Clin. Invest.*, juin 1959, 38 (6), 1021.)
90. MARRACK (J.) et THACKER (G.). — The state of calcium in body fluids. (*In Biochem. J.*, 1926, 20, 580.)
91. MAURAT (J.P.). — Le magnésium en pathologie. (*Thèse*, Expansion Scientifique, 1958.)
92. MC CANCE (R.A.) et WATCHORN (E.). — Inorganic constituents of C.S.F. 1) Calcium and magnesium. (*Quart. J. Med.*, 1931, 24, 371.)
93. MC ILWAIN (H.). — Biochemistry and the central nervous system. (London, Churchill, 1955.)
94. MC ILWAIN (H.). — Chemotherapy and the central nervous system. (Churchill éd., 1957.)
95. MC LEAN (F.) et HASTINGS (A.B.). — The state of calcium in the fluids of the body (conditions affecting the ionization of calcium). (*In Journ. Biol. Chemistry*, 1935, 108, 1, 285.)
96. MC LEAN (F.) et HASTINGS (A.B.). — Clin. estimation and significance of calcium ion concentration in blood. (*Am. J. Med. Sc. N.S.*, 1935, 189, 601.)
97. MERKLEN (F.P.), BERTHAUX (P.) et FORMAN (J.). — Modifications de l'onde T de l'E.C.G. au cours des tétanies expérimentales et de l'hyperkaliémie-comparaison. (*C.R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 232-235, 707-709, 866-870, 905-908.)
98. MERRITT (H.) et BAUER (W.). — The equilibrium between C.S.F. and blood plasma: III: the distribution of Ca and P between C.S.F. and blood serum; IV: the calcium content of serum, C.S.F. and aqueous humors at different levels of parathyroid activity. (*In Journ. Biol. Chemistry*, 1931, 90, pp. 215 et 233.)
99. MEYSENBURG (L. von), PAPPENHEIMER (A.M.), ZUCKER (T.F.) et MURRAY (M.F.). — The diffusible calcium of the blood serum: methods for determination. (*In Journ. Biol. Chemistry*, 1921, 3, 529.)
100. MORGULIS (S.) et PERLEY (A.M.). — Studies on cerebrospinal fluid and serum calcium with special reference to the parathyroid hormone. (*In Journ. Biol. Chemistry*, 1930, 88, 169.)
101. MORRISON (R.S.), MC LEAN (R.) et JACKSON (E.B.). — Observation on the relation, between ionized and total calcium in normal and abnormal sera and their ultrafiltrates. (*J. Biol. Chem.*, 1938, 122, 439.)
102. MURALT (A. von). — Neue ergebnisse der Nervenphysiologie, p. 113. (Springer-Verlag, 1958.)

103. NATELSON et PENNIALL. — Colorimetric estimation of ultramicro-quantities of Ca in human serum as the complex with alizarine. (In *Anal. Chem.*, 1955, 27, pp. 434-437.)
104. NEUHAUSEN (B.S.) et PINCUS (J.B.). — A study of the condition of several inorganic constituents of serum by means of ultrafiltration. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1923, 57 (1), 99.)
105. NICHOLAS (H.O.). — Diffusible serum calcium by high pressure ultrafiltration. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1932, 97, 457.)
106. NICOLAYSEN (R.), EEG-LARSEN (N.) et OLE JACOB-MALM. — Physiology of calcium metabolism. (In *Physiology Rev.*, 1953, 33, 424.)
107. OSTERTAG (H.) et RINCK (E.). — Dosage colorimétrique du calcium à l'aide de la murexide. (In *C.R. Ac. Sciences*, 1950, 231, 1304 ; 1951, 232, 629 ; et *Chim. Anal.*, 1952, 34, 108.)
108. PASCAL (P.). — Nouveau traité de chimie minérale, tome IV, p. 292 (Ca++). (Masson éd., 1958.)
109. PAUPE (J.). — Etude critique de certaines méthodes de dosage du calcium dans le sang. Contribution à l'étude de l'hypocalcémie chronique idio-pathique du nourrisson. (Thèse, Paris, 1955, n° 744.)
110. PEETERS (H.). — Binding of calcium in blood in the presence of anti-coagulants. (In *Am. Journ. of Clin. Path.*, mai 1959, 31 (5), 394.)
111. PESEZ (M.) et POIRIER (P.). — Méthodes et réactions de l'analyse organique. (Masson éd., 1954.)
112. PETERS (J.P.) et VAN SLYKE (D.D.). — Quantitative clinical chemistry, interpretations. (Baltimore, 1931, 805, 61.)
113. POLICARD (A.) et BAUD (C.A.). — Les structures microscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissus. (Masson éd., 1958.)
114. POLLARD (F.H.) et MARTIN (J.V.). — The spectrophotometric determination of the alkalino-earth metals with murexide, eriochrome black T. and with o-cresolphthaléine complexone. (In *Analyst.*, 1956, 81, 348.)
115. POSTERNAK (J.) et VOEGELI (H.). — Effects of calcium and potassium depolarisation and conduction blockade in frog nerve. (In *Metabolism of the Nervous System*, Richter-Pergamon éd., 1957.)
116. POULOS (P.). — A method of plasma dialysis and its application to the determination of the diffusible fraction of calcium. (In *J. Lab. and Clin. Med.*, 49, 2, 292.)
117. PRASAD (A.S.) et FLINK (E.B.). — The base binding property of the serum proteins with respect to calcium. (In *J. Lab. Clin. Med.*, mars 1958, 51, 3, 345.)
118. PRASAD (A.S.) et FLINK (E.B.). — Effect of carbon dioxide on concentration of calcium in an ultrafiltrate of serum obtained by centrifugation. (In *J. Appl. Physiol.*, 1957, 10, 103.)

119. PRASAD (A.S.), BROWN (E.B.) et FLINK (E.B.). — Plasma ultrafiltrable calcium in respiratory alkalosis and acidosis. (In *Am. Journ. Physiol.*, 1957, 190, 459.)
120. PRASAD (A.S.) et FLINK (E.B.). — The determination of ultrafiltrable calcium in a variety of clinical conditions. (In *Journ. Lab. and Clin. Med.*, juillet 1958, 52 (1), 1.)
121. RAAFLAUB (J.). — Über ein photometrisches Verfahren zur bestimmung des ionisierten calcium. (In *Hoppe-Seyler's Zeit. Physiol. Chem.*, 1951, 288, 228.)
122. RAAFLAUB (J.). — Applications of metal buffers and metal indicators in biochemistry. (In *Methods of Biochemical Analysis*, vol. III, p. 301, par D. Glick, Interscience, 1956.)
123. RAPOPORT (S.), STEVENS (C.D.), ENGLE (L.), FERRIS (E.B.) et LOGAN (M.). — The effect of voluntary overbreathing on the electrolyte equilibrium of arterial blood in man. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1946, 163, 411.)
124. RAWSON et SUNDERMAN. — Calcium binding property of serum proteins. (In *Journ. Clin. Investig.*, 1948, 27, 82.)
125. RICHTER (D.). — Metabolism of the nervous system. (*Proceedings of the 2nd Int. Neurochemical Symposium*, 1956. Pergamon, 1957.)
126. RONA (P.) et TAKAHASHI (D.). — Beitrage zur frage nach dem Verhalten des Kalziums in serums. (In *Biochem. Zeit.*, 1911, 31, 336 et 1913, 49, 370.)
127. RONA (P.) et MELLI (G.). — Beitrage zur frage der Ionen verteilung im Blut serum (III). (*Biochem. Zeitschrift*, 1925, 166, 242.)
128. ROSE. — Determination of the ionized and ultrafiltrable calcium. (In *Clinica Chimica Acta*, 1957, 2, 227.)
129. ROSE (G.). — Symposium on some new approaches to calcium metabolism. (*Proc. of the Royal Soc. of Med.*, May 1959, 52 (5), 347-349.)
130. ROTH (B.) et NEVSIMAL (O.). — E.E.G. study of 42 cases of hypocalcemic tetany, E.E.G. studies of 89 cases of normocalcemic tetany. Czechoslovak E.E.G. Committee. (In *E.E.G. and Clin. Neurophysiol.*, février 1959, XI (1), 181.)
131. SANDELL (E.B.). — Colorimetric determination of traces of metals, p. 366. (New York, 1959, 3^e édit.)
132. SCHIRARDIN (H.) et MÉTAIS (P.). — Détermination simultanée du calcium et du magnésium en présence de calcéine. Etude comparative avec d'autres méthodes. (In *Pathologie et Biologie*, 1959, 7 (3-4), 418-423.)
133. SCHIRARDIN (H.) et MÉTAIS (P.). — Une méthode simple de détermination des fractions du calcium plasmatique. (In *Annal. Biol. Clin.*, 1959, XVII (7-9), 465.)

134. SCHMIDT. — Occurences, transport and regulation of calcium magnesium and phosphates in animal organism. (In *Physiol. Rev.*, 1935, 15, 297.)
- 134 bis. SCHULTHESS, SALLMANN (B. Von). — Der Einfluss experimentelle acide und alkalose auf die Ultrafiltrierbarkeit des Plasmacalciums und die Calciumausscheidung im Urin beim Menschen. (In *Helvetica Medica Acta*, novembre 1958, 25, 5, 601-616.)
135. SCHWARZENBACH (G.) et GYSLING (H.). — Metall indikatoren: murexid als indicator auf calcium und andere metall, ionen complexbildung und Lichtabsorption. (In *Helv. Chim. Acta*, 1949, 32, 1314.)
136. SCHWARZENBACH (G.). — Die komplexometrische Titration. (In *Die Chemische Analyse*, vol. 45. Enke, Stuttgart, 1955.)
137. SEALY (W.C.), YOUNG (W.G.) et HARRIS (J.S.). — Studies on cardiac arrest: the relationship of hypercapnia to ventricular fibrillation. (In *Journ. Thoracic Surgery*, 1954, 28, 447.)
138. SHANES (A.M.). — Electrochemical aspects on physiological and pharmacological action in excitable cells. (In *Pharm. Rev.*, mars 1958, 10 (1), 59.)
139. SMEETS et SEEKLES. — Determination of the content of calcium ions in milk ultrafiltrate. (In *Nature*, 1952, 169, 802.)
140. SMITH (R.G.). — Non diffusible serum calcium at various calcium phosphate and H ion concentration. (In *Biochem. Journal*, 1934, 28 (2), 1615.)
141. SNELL (F.D.) et SNELL (C.T.). — Colorimetric methods of analysis (inorganic). (Vol. II A, Princeton, 1959.)
142. SNELL (A.M.). — The diffusibility of the calcium in the blood serum under normal and physiologic conditions. (*Proc. Staff Meet. Mayo Clinic*, 1930, 5, 17.)
143. SOULIER (J.P.) et CROSNIER (J.). — Nouvelle méthode de dosage du calcium ionisé utilisant un système coagulant. 1) Technique. (*La Presse Médicale*, 66 (28), 617-619.) 2) Résultats. (*La Presse Médicale*, 66 (37), 325-327.)
144. TAMMELIN et MORGENSEN. — Microquantitative determination of calcium as murexide complex in the presence of magnesium. (In *Acta Chem. Scand.*, 1952, 6, 988-992.)
145. TEREPKA (A.R.), TORIBARA (T.) et DEWEY (P.A.). — The ultrafiltrable calcium of human serum. II. Variations in disease states and under experimental conditions. (*J. of Clin. Invest.*, 1958, 37 (1), 87.)
146. THIÉBAUT (F.), ROHMER (F.) et WACKENHEIM (A.). — Contribution à l'étude électroencéphalographique des syndromes endocriniens. (*E.E.G. and Clin. Neurophysiol.*, février 1958, X (1), 1-30.)
147. THOMPSON (R.M.S.) et KING (E.J.). — Biochemical disorders in human disease. (Churchill éd., 1959.)

148. THOMSON et COLLIP. — The parathyroid glands. (In *Physiol. Rev.*, 1932, 12 (3), 309.)
 149. TOMASSON et HELGI. — Psychische Beeinflussung des Serum calcium spiegels ; Vorläufige Mitteilung. (*Klin. Woch.*, 1924, 3, 2055-2056.)
 150. TORIBARA (T.Y.), TEREPA (A.R.) et DEWEY (P.A.). — The ultrafiltrable calcium of human serum. Ultrafiltration methods and normal values. (In *J. Clin. Investig.*, 1957, 36, 738-748.)
 151. TSAO. — Colorimetric determination of serum calcium. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1952, 199, 251.)
 152. UPDEGRAFF (H.), GREENBERG (D.M.) et CLARK (F.W.). — A study of the distribution of the diffusible and non-diffusible calcium in the blood sera of normal animals. (In *Journ. Biol. Chemistry*, 1926, 71, 87.)
 153. USSING (H.H.). — Ionic movements in cell membranes in relation to the activity of the nervous system. (In *Biochemistry of the Central Nervous System* ed., Brucke, p. 1. Pergamon, 1959.)
 154. VELLUZ (L.) et DESCHASEAUX (R.). — Technique de microdosage du calcium dans le sérum sanguin. (*C.R. Soc. Biol.*, 1930, 104, 977-978.)
 - 154 bis. VERDEAUX (G.) et VERDEAUX (J.). — Description d'une technique de polygraphie. (*E.E.G. Clin. Neurophysiol.*, novembre 1955, 7 (4), 645-648.)
 155. VERDEAUX (G. et J.), SCHULLER (E.) et BONNAFÉ (M.). — La polygraphie sous contrôle biochimique. (*Com. Soc. E.E.G.*, 3 décembre 1958 ; — *Rev. Neurologique*, 1959, 101 (3), 276-278.)
 156. WACKENHEIM (A.). — Contribution à l'étude électroencéphalographique des syndromes endocriniens. (*Thèse*, Strasbourg, 1955, n° 28.)
 157. WATCHORN (E.) et Mc CANCE (R.A.). — Inorganic constituents of C.S.F. II. The ultrafiltration of calcium and magnesium from human sera. (*Biochem. J.*, 1932, 26, 54.)
 158. WEIL (M.P.) et GUILLAUMIN (C.O.). — La calcémie. (*Rapport au Congrès Français de Médecine*, XXI^e session, Liège, Masson éd., 1930.)
 159. WILLIAMS (M.B.) et MOSER (J.H.). — Colorimetric determination of calcium with ammonium purpurate. (In *Analytical Chemistry*, 1953, 25 (9), 1414.)
 160. YANAGISAWA. — New colorimetric determination of calcium and magnesium. (In *Journ. Biochem.*, 1955, 42, 3, 11.)
-

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : Courbe de dialyse du glucose en fonction de la température	45
FIGURE 2 : Principe de la dialyse	46
FIGURE 3 : Le plateau de dialyse en place	55
FIGURE 4 : Plateau de dialyse ouvert	56
FIGURE 5 : Spectre d'absorption de la murexide pure et de sa forme complexée avec le Ca^{++} (purpurate de Ca)	60
FIGURE 6 : Exemple d'étalonnage et de dosages du Ca^{++} sur sérum	65
FIGURE 7 : Le principe du photomètre enregistreur	67
FIGURE 8 : L'auto-analyseur	68
FIGURE 9 : 110 dosages de Ca^{++} sur sérum (tampon véronal ClH à pH 7,4) ..	70
FIGURE 10 : Courbe de répartition des résultats (calcium total) par la méthode de GAUTHIER et PIGNARD (101 dosages)	70
FIGURE 11 : La polygraphie (E.E.G.)	80
FIGURE 12 : La polygraphie : le contrôle biochimique	81
FIGURE 13 : Exemple d'enregistrement de la glycémie	82
FIGURE 14 : Une épreuve d'hyperglycémie provoquée	84
FIGURE 15 : Une épreuve d'hypoglycémie provoquée	84
FIGURE 16 : Exemple d'un montage polygraphique avec contrôle biochimique continu	85

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	15
Chapitre I. — LE CALCIUM DU SANG	17
I. Répartition du calcium dans l'organisme	17
II. Les différentes fractions du calcium plasmatique	18
Chapitre II. — ROLE ET VARIATIONS DU Ca^{++}	27
I. Généralités	27
II. Calcium ionisé et métabolisme cardiaque	28
III. Ca^{++} et activité neuronique	29
IV. Ca^{++} et coagulation du sang	33
V. Ca^{++} et parathyroïdes	34
VI. Ca^{++} et équilibre acido-basique	36
VII. Variations pathologiques du Ca^{++}	38
Chapitre III. — LE DOSAGE DU CALCIUM NON PROTÉIQUE PAR DIALYSE	43
I. Principe de la dialyse	43
II. Ultrafiltration et dialyse	47
III. Description analytique de la méthode	48
Chapitre IV. — RÉSULTATS DU DOSAGE DU CALCIUM NON PROTÉIQUE PAR DIALYSE	69
I. Isolement d'une nouvelle fraction calcique	69
II. Modifications récentes de la technique	71
III. Dosages du calcium non protéique sur sang total	74
IV. Critique des résultats obtenus	76
Chapitre V. — LA POLYGRAPHIE SOUS CONTRÔLE BIOCHIMIQUE	79
CONCLUSIONS	87
BIBLIOGRAPHIE	89

